



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 202 611** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/32, 15/11, 15/82**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 94032101/13, 05.10.1992
(24) Дата начала действия патента: 05.10.1992
(30) Приоритет: 04.10.1991 US 772,027
25.09.1992 US 951,715
(43) Дата публикации заявки: 27.05.1996
(46) Дата публикации: 20.04.2003
(56) Ссылки: EP 0374753 A, 26.07.1990. EP 0348348 A, 27.12.1989. EP 0359472 A, 23.03.1990. WO 91/10725 A, 25.07.1991.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 01.04.1994
(86) Заявка РСТ: US 92/08476 (05.10.1992)
(87) Публикация РСТ: WO 93/07278 (15.04.1993)
(98) Адрес для переписки: 101000, Москва, пер. М. Златоустинский 10, кв.15, бюро "ЕВРОМАРКПАТ", Кузенковой Н.В., рег.№ 0482

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)
(72) Изобретатель: КОЗИЕЛ Майкл Дж. (US), ДИЗАЙ Налини М. (US), ЛИУИС Келли С. (US), КРАМЕР Венс К. (US), УОРРЕН Грегори В. (US), ИВОЛА Стефен В. (US), КРОССЛЭНД Лайл Д. (US), РАЙТ Марта С. (US), МЕРЛИН Элис Дж. (US), ЛАУНИС Карен Л. (US), РОТСТЕЙН Стивен Дж. (US)
(73) Патентообладатель:
НОВАРТИС АГ (CH)
(74) Патентный поверенный:
Кузенкова Наталья Васильевна

(54) **НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (ВАРИАНТЫ), РЕКОМБИНАНТНАЯ МОЛЕКУЛА ДНК, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ДЛЯ КУКУРУЗЫ КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИНСЕКТИЦИДНОГО ПРОТЕИНА, СПОСОБ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ОТ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ**

(57)
Изобретение может быть использовано в селекции растений. Нуклеотидные последовательности, кодирующие инсектицидный протеин, вводят в растения. Оптимизация вводимых в растение последовательностей применительно к геному кукурузы позволяет увеличить сопротивляемость растения насекомым более, чем в 100 раз. Использование ткане-предпочтительных и тканеспецифических промоторных последовательностей обеспечивает высокие уровни инсектицидной активности в растениях кукурузы. 6 с. и 22 з.п.ф-лы, 38 ил., 2 табл.

```

      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *
BTHKURHD ATGGAATAACAAATCCGAACATCAACGAATGCAATTCCTATATAATTGTTAAGTAACCCGTGAA
flsynbt.fin .....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....G
bssyn .....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....G

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD CTAGAACTATTAGGTGGAGAAAGAAATAGAAACTGGTTACAGCCCAATGATATTTCCTTG
flsynbt.fin ..G..G..GC..G..C.....GC..C..C..G..C.....C.....C.....CAG..C..
bssyn .....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....G

      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD TCCGTAACGCCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCGCCGGTGGTGGATTGTGTATGAGCTA
flsynbt.fin AGC..G..C..G..C.....GC.....C..G.....C.....C.....C.....G..G..G
bssyn AGC..G..C..G..C.....GC.....C..G.....C.....C.....C.....C.....G

      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD GTTCATATAATATGGGGAATTTTGTGTCCTCTCAATGGGAGCGCATTTCTGTACAAAT
flsynbt.fin ..C..C..C..C.....C..C..C.....AGC..G.....C.....C.....G..G..C
bssyn ..G..C..C..C.....C.....C.....AGC..G.....C.....C.....G..G..C

      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD GAAGACTTAATTAGCAAAAGAAATAGAGAAATTCGGTAGGAGCCAAAGGCAATTTCTAGACTTA
flsynbt.fin ..G..C..G..C.....GC..C..G..G.....CC..C.....C.....CAGCC..CC..G
bssyn ..G..C..G..C.....GC..C..G..G.....CC..C.....C.....CAGCC..CC..G

      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAAATTTAGCGAGAAATCTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
flsynbt.fin ..G..C..G.....C.....G.....C.....C.....GAGC...CC..C.....G..C..C
bssyn ..G..C..G.....C.....G.....C.....C.....GAGC...CC..C.....G..C..C

      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD CCTACTAATCCAGCATTAAGASAAAGAGATGGCTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGGC
flsynbt.fin ..C..C..C..C.....CC..GC..C..G.....C.....C.....G.....C.....C...
bssyn ..C..C..C..C.....CC..GC..C..G.....C.....C.....G.....C.....C...

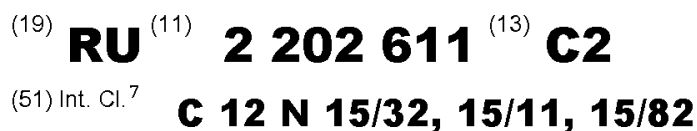
      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD CTTACAACCGCTATTCTCTTTTGGAGTTCAAAATATCAAGTTCCTCTTTATCAATA
flsynbt.fin ..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..G..C..C..G..C..G..GAGC..G
bssyn ..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..G..C..C..G..C..G..GAGC..G

      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD TATGTTCAAGTGCAGAAATTTACATTTATCAGTTTGGAGAGATGTTTCAAGTCTTTGGACAA
flsynbt.fin ..C..G..G..C..C.....CC..G...CC..GAGC...GC..C..C..C.....CAGC...C..C..G
bssyn ..C..G..G..C..C.....CC..G...CC..GAGC...GC..C..C..C.....CAGC...C..C..G

      550     560     570     580     590     600
      *      *      *      *      *      *
BTHKURHD AGGTGGGGATTGATGCCCGCACTATCATAGTCTTATTAATGATTAAGCTAGGCTTATT
flsynbt.fin C..C.....C..C.....C.....C.....C.....C.....C.....CC..G..CC..C..G..C
bssyn C..C.....C..C.....C.....C.....C.....C.....C.....CC..G..CC..C..G..C

```

Φ_{HL}: 1

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 94032101/13 , 05.10.1992

(24) Effective date for property rights: 05.10.1992

(30) Priority: 04.10.1991 US 772,027
25.09.1992 US 951,715

(43) Application published: 27.05.1996

(46) Date of publication: 20.04.2003

(85) Commencement of national phase: 01.04.1994

(86) PCT application:
US 92/08476 (05.10.1992)

(87) PCT publication:
WO 93/07278 (15.04.1993)

(98) Mail address:
101000, Moskva, per. M. Zlatoustinskij 10,
kv.15, bjuro "EVROMARKPAT", Kuzenkovoj N.V.,
req.No 0482

(71) Applicant:
NOVARTIS AG (CH)

(72) Inventor: KOZIEL Majkl Dzh. (US),
DIZAJ Nalini M. (US), LIUIS Kelli S.
(US), KRAMER Vens K. (US), UORREN Gregori
V. (US), IVOLA Stefen V. (US), KROSSLEhND Lajl
D. (US), RAJT Marta S. (US), MERLIN Ehliis Dzh.
(US), LAUNIS Karen L. (US), ROTSTEJN Stiven
Dzh. (US)

(73) Proprietor:
NOVARTIS AG (CH)

(74) Representative:
Kuzenkova Natal'ia Vasil'evna

(54) NUCLEOTIDE SEQUENCES (VARIANTS), RECOMBINANT DNA MOLECULE, METHOD FOR PREPARING SEQUENCE ENCODING INSECTICIDE PROTEIN OPTIMIZED FOR MAIZE, METHOD FOR PROTECTION OF MAIZE AGAINST INSECT-PESTS

(57) Abstract:

FIELD: genetic engineering, agriculture.
SUBSTANCE: method involves incorporation of nucleotide sequences encoding insecticide protein into plants. Optimization of sequences incorporating into plant with regards to maize genome allows to enhance the resistance of plant against insects by above 100 times. The use of tissue-preferable and tissue-specific promoter sequences provides high levels of insecticide activity in maize plants. Invention can be used in plants selection. EFFECT: improved preparing and protection method. 28 cl. 38 dwg. 2 tbl

[illegible]

Текст описания в факсимильном виде (см. чертежи) Т Тн

Формула изобретения:

1. Нуклеотидная последовательность, содержащая последовательность, оптимизированную для кукурузы, которая кодирует протеин, способный убивать насекомых, где указанная кодирующая последовательность содержит по меньшей мере 90% последовательности, оптимизированной для кукурузы, выбранной из группы, включающий SEQ ID Nos 2, 3 и 4, или из группы последовательностей, приведенных на фиг.6, 7, 9, 11, 13 и 15.

2. Нуклеотидная последовательность по п.1, где указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин и является последовательностью 3, последовательностью 4 или последовательностью, представленной на фиг.7.

3. Нуклеотидная последовательность по п.1, где указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин, который термостабилен по сравнению с нативным CryIA(b) протеином, и является последовательностью, выбранной из группы, включающей последовательность, представленную на фиг.9, 11, 13 и 15.

4. Нуклеотидная последовательность по п.1, где указанная кодирующая последовательность содержит последовательность, которая кодирует CryIB протеин, и представлена на фиг.6.

5. Нуклеотидная последовательность по п.1, дополнительно включающая первый промотор, обеспечивающий направленную экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке, операбельно связанный с указанной кодирующей последовательностью.

6. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор обеспечивает направленную экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в клетке кукурузы.

7. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор выбирается из группы, включающей индуцибельные промоторы, конститутивные промоторы, промоторы, регулируемые в процессе развития или во времени, ткане-предпочтительные или ткане-специфические промоторы.

8. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор обеспечивает направленную специфическую для зеленых тканей экспрессию указанного гена в растительных клетках.

9. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор выбирают из группы, включающей CaMV 35S промотор, CaMV 19S промотор, промотор PER карбоксилазы, промотор, обеспечивающий предпочтительную для сердцевин стебля экспрессию, и промотор, обеспечивающий специфичную для пыльцы экспрессию.

10. Нуклеотидная последовательность по п.8, где указанный промотор является промотором PER карбоксилазы.

11. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор обеспечивает предпочтительную для сердцевин стебля экспрессию и содержит последовательность ДНК, представленную на фиг.24.

12. Нуклеотидная последовательность по п.5, где указанный промотор обеспечивает специфическую для пыльцы экспрессию и содержит последовательность ДНК, представленную на фиг.35.

13. Нуклеотидная последовательность по п.5, дополнительно включающая второй промотор, обеспечивающий направленную экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в растительной клетке, операбельно связанный со второй последовательностью, как описано в любом из пп.5-12.

14. Нуклеотидная последовательность по п.13, где указанная вторая кодирующая последовательность является оптимизированной последовательностью, которая кодирует протеин, убивающий насекомое.

15. Нуклеотидная последовательность по п.14, где указанная вторая последовательность кодирует протеин *Bacillus thuringiensis* (B.t.).

16. Нуклеотидная последовательность по п.15, где указанная вторая последовательность кодирует CryIA(b) протеин.

17. Нуклеотидная последовательность по п.13, где указанная вторая кодирующая последовательность является маркерным геном.

18. Нуклеотидная последовательность, обеспечивающая направленную предпочтительную для сердцевин стебля экспрессию связанного с ней структурного гена в растении и содержащая последовательность ДНК, представленную на фиг.24.

19. Нуклеотидная последовательность, обеспечивающая специфическую для пыльцы экспрессию связанного с ней структурного гена в растении и содержащая последовательность ДНК, представленную на фиг.35.

20. Рекombинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность по п.18 или 19, операбельно связанную со структурным геном, кодирующим протеин насекомых.

21. Рекombинантная молекула ДНК по п.20, где указанный структурный ген представляет собой последовательность, которая кодирует инсектицидный протеин, по любому из пп.1-17.

22. Способ получения оптимизированной для кукурузы нуклеотидной последовательности по любому из пп.1-4, включающий определение аминокислотной последовательности кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью инсектицидного протеина и замену нативных кодонов в кодирующей этот протеин последовательности на кодоны, которые наиболее предпочтительны для кукурузы.

23. Способ защиты растений кукурузы по меньшей мере от одного насекомого-вредителя, включающий стабильную трансформацию растения кукурузы по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью по любому из пп.1-17, или рекombинантной молекулой ДНК по п.20 или 21, где кодирующая последовательность кодирует инсектицидный протеин; за счет чего трансформированное растение кукурузы

экспрессирует инсектицидный протеин в количестве, достаточном для защиты растения от насекомых-вредителей.

24. Способ по п.23, где инсектицидные протеины экспрессируются в количестве, достаточном для борьбы с чешуекрылыми или жесткокрылыми насекомыми-вредителями.

25. Способ по п.23, где инсектицидный протеин экспрессируется в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми, выбранными из группы, состоящей из мотылька кукурузного, огневки сахарного тростника, совки, бабочки, походных червей,

листоедов, проволочника и тлей.

26. Способ по любому из пп.22-25, где указанный инсектицидный протеин является протеином B.t.

5 27. Способ по 23, где протеин B.t. является CryIA(b) протеином.

28. Способ по п.23, в котором используют ткане-специфический или ткане-предпочтительный промотор.

Приоритет по пунктам:

10 04.10.1991 по пп.1-3, 5-14,
25.09.1992 по пп.4, 15-28.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к ДНК последовательностям, кодирующим инсектицидные протеины и к экспрессии этих последовательностей в растениях.

Предпосылки изобретения

Ранее было показано, что экспрессия генов инсектицидных протеинов (IP), полученных из Bacillus thuringiensis (Bt), в растениях является чрезвычайно трудной задачей. Были предприняты попытки экспрессировать в растениях комбинации химерный промотор/Bt IP ген. Обычно в трансгенных растениях удавалось достичь только низких уровней протеина. См., например, Vaesch et al.,

RU 2 202 611 C 2

RU 2 202 611 C 2

Nature 328: 33-37, 1987; Barton et al., Plant Physiol. 85: 1103-1109, 1987; Fischhoff et al., Bio/Technology 5: 807-813, 1987.

Одно из выдвинутых объяснений низкой экспрессии состоит в том, что случайные сайты процессинга транскрипции продуцируют абберантные формы Bt IP мРНК транскрипта. Такие абберантно процессированные транскрипты являются нефункциональными в растении в плане продуцирования инсектицидного протеина. Возможные сайты процессинга включают сайты полиаденилирования, сайты сплайсинга интронов, сигналы терминации транскрипции и транспортные сигналы. Большинство генов не содержит таких сайтов, которые оказывали бы вредное воздействие на экспрессию генов в нормальном организме - хозяине. Однако, случайное существование таких сайтов процессинга в кодирующем участке может осложнить экспрессию такого гена в трансгенном хозяине. Так, например, кодирующий участок для гена Bt инсектицидного кристаллического протеина, происходящего из Bacillus thuringiensis штамма kurstaki (GENBANK BTHKURHD, каталог M15271, B. thuringiensis var. kurstaki, HD-1; Geiser et al., Gene 48: 109-118 (1986)), полученного прямо из Bacillus thuringiensis, может содержать сайты, которые предотвращают соответствующий процессинг этого гена в растениях.

Дальнейшие трудности возникают при попытках экспрессии протеина Bacillus thuringiensis в таком организме, как растение. Было обнаружено, что частота использования кодонов для нативного Bt IP гена существенно отличается от той, которая типична для гена растения. В частности, частота использования кодонов для нативного Bt IP гена чрезвычайно отличается от частоты использования для гена кукурузы. В результате, мРНК этого гена не может быть эффективно использована. Частота использования кодонов может повлиять на экспрессию генов на уровне трансляции или транскрипции или мРНК процессинга. Для оптимизации экспрессии инсектицидного гена в растениях были предприняты попытки такого изменения гена, чтобы он насколько возможно, соответствовал бы генам, нативно содержащимся в том растении-хозяине, которое должно быть трансформировано. EP 0359472 (1990) (Adang et al.) относится к синтетическому Bacillus thuringiensis tenebrionis (Btt) гену, который на 85% гомологичен нативному Btt гену, и который был сконструиро-

ван таким образом, чтобы содержание А + Т приближалось к тому, которое найдено в растениях обычно. В таблице 1 (Adang et al.) показана последовательность кодонов синтетического Btt гена, которая создана так, чтобы более близко соответствовать нормальному распределению кодонов генов двудольных. Adang et al. утверждает, что синтетический ген, кодирующий IP, можно оптимизировать для усиления экспрессии в однодольных растениях аналогичными способами, и представляет частоту использования кодонов с высокой степенью экспрессируемых протеинов однодольных в таблице 1. На стр.9 Adang et al. утверждают, что синтетический Btt ген сконструирован так, чтобы он имел содержание А + Т 55% (и, соответственно, содержание G + C 45%). На стр.20 Adang et al. указано, что синтетический ген сконструирован за счет такого изменения отдельных аминокислотных кодонов в нативном Bt гене, чтобы оно отражало полное распределение кодонов, предпочтительных для генов двудольных для каждой аминокислоты в кодирующем участке гена. Далее, Adang et al. указывают, что только некоторые из кодонов нативного Btt гена можно заменить наиболее предпочтительным для растений кодоном для каждой аминокислоты, так что полное распределение кодонов, используемых в протеинах двудольных сохраняется.

EP 0385962 (1990) (Fischhoff et al.), относится к генам растений, кодирующим кристаллический протеиновый токсин Bacillus thuringiensis. В таблице V, Fischhoff et al. раскрывают проценты использования кодонов для каждой аминокислоты. На стр.8 Fischhoff et al. предлагают модификацию нативного Bt гена за счет удаления мнимых сигналов полиаденилирования и АТТТА последовательностей. Далее Fischhoff et al. предлагают сканирование последовательности нативного Bt гена для участков, которые содержат более четырех соседних адениновых или тиминовых нуклеотидов для идентификации предполагаемых растительных сигналов полиаденилирования. Fischhoff et al. указывают, что нуклеотидную последовательность нужно изменить, если более чем один предполагаемый сигнал полиаденилирования идентифицирован внутри последовательно расположенных десяти нуклеотидов. На стр.9 Fischhoff et al. указывают, что должны быть предприняты попытки отбора кодонов для предпочтительного установления содержания G + C до около 50%.

PNAS USA, 88: 3324-3328 (1991) (Perlak et al.) относится к модифицированным кодирующим последовательностям Bacillus thuringiensis cryIA(b) гена, аналогичным тем, которые представлены у Fischhoff et al. Как видно из таблицы 1 на стр.3325, частично модифицированный cryIA(b) ген (Perlak et al.) приблизительно на 96% гомологичен нативному cryIA(b) гену (1681 из 1743 нуклеотидов), с содержанием G + C 41%, число растительных последовательностей сигналов полиаденилирования (PPSS) снижено с 18 до 7, а число ATTТА последовательностей снижено с 13 до 7. Полностью модифицированный cryIA(b) ген (Perlak et al.), как описано, является полностью синтетическим (стр.3325, колонка 1). Этот ген приблизительно на 79% гомологичен нативному cryIA(b) гену (1455 из 1845 нуклеотидов), с содержанием G + C 49%, число растительных последовательностей сигналов полиаденилирования (PPSS) снижено до 1, и все ATTТА последовательности удалены.

EP 0431829 (1991) (Barton et al.) относится к экспрессии инсектицидных токсинов в растения. В колонке 10 Barton et al. раскрывают конструирование синтетического AaIT гена токсина насекомых, кодирующего токсин скорпиона, с использованием наиболее предпочтительного кодона для каждой аминокислоты в соответствии с картой, представленной на фиг.1 документа.

Краткое содержание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам усиления экспрессии гетерологичных генов в растительных клетках. Обычно ген или представляющий интерес кодирующий участок конструируют для обеспечения специфической предпочтительной последовательности кодонов для растения. Таким образом, частоту использования кодона для конкретного протеина изменяют для усиления экспрессии в конкретном растении. Такие оптимизирующие растительные кодирующие последовательности можно операбельно связать с промоторами, способными управлять экспрессией кодирующей последовательности в растительных клетках.

Одной из целей изобретения является создание синтетических инсектицидных протеиновых генов, которые были оптимизированы для экспрессии в растениях.

Другой целью изобретения является создание синтетических Bt инсектицидных протеиновых генов, экспрессия которых была бы максимизирована в растениях, предпочтительно в кукурузе. Одной из особенностей настоящего изобретения является то, что синтетический Bt IP ген конструируют, используя наиболее предпочтительные для кукурузы кодоны, кроме изменений, необходимых для обеспечения сайтов лигирования для конструирования полностью синтетического гена.

Согласно настоящему изобретению предлагается нуклеотидная последовательность, содержащая последовательность оптимизированную для кукурузы, которая кодирует протеин, способный убивать насекомых, при этом указанная кодирующая последовательность содержит по меньшей мере 90 % последовательности оптимизированной для кукурузы, выбранной из группы, включающей SEQ ID Nos 2, 3 и 4, или из группы последовательностей, приведенных на фиг.6, фиг.7, фиг.9, фиг.11, фиг.13 и фиг.15.

Предпочтительны: нуклеотидная последовательность, где указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин и является последовательностью 3, последовательностью 4 или последовательностью, представленной на фиг.7; или нуклеотидная последовательность, где указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин, который термостабилен по сравнению с нативным CryIA(b) протеином, и является последовательностью, выбранной из группы, включающей последовательность, представленную на фиг.9, фиг.11, фиг.13 и фиг.15; либо нуклеотидная последовательность, где указанная кодирующая последовательность содержит последовательность, которая кодирует CryIB протеин, является последовательностью, которая представлена на фиг.6.

Нуклеотидная последовательность может дополнительно включать первый промотор, обеспечивающий направленную экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке, операбельно связанный с указанной кодирующей последовательностью.

В частности, нуклеотидная последовательность включает промотор, обеспечивающий направленную экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в клетке кукурузы.

Обычно нуклеотидная последовательность включает промотор, который выбирается из группы, включающей индуцибельные промоторы, конститутивные промоторы, промоторы, регулируемые в процессе развития или во времени, ткане-предпочтительные или ткане-специфические промоторы.

В частности нуклеотидная последовательность включает промотор, обеспечивающий направленную специфическую для зеленых тканей экспрессию указанного гена в растительных клетках.

Как правило, нуклеотидная последовательность включает промотор, который выбирают из группы, включающей CaMV 35S промотор, CaMV 19S промотор, промотор PER карбоксилазы, промотор, обеспечивающий предпочтительную для сердцевины стебля экспрессию, и промотор, обеспечивающий специфичную для пыльцы экспрессию.

Предпочтительно промотор является промотором PER карбоксилазы.

11. Нуклеотидная последовательность может включать указанный промотор обеспечивающий предпочтительную для сердцевины стебля экспрессию, и содержащий последовательность ДНК, представленную на фиг.24.

Нуклеотидная последовательность может включать указанный промотор который обеспечивает специфическую для пыльцы экспрессию, и содержит последовательность ДНК, представленную на фиг.35.

Нуклеотидная последовательность может дополнительно включать второй промотор, обеспечивающий направленную экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в растительной клетке, операбельно связанный со второй последовательностью, как описано выше.

Предпочтительна нуклеотидная последовательность, в которой указанная вторая кодирующая последовательность является оптимизированной последовательностью, которая кодирует протеин, убивающий насекомое.

В частности, указанная вторая последовательность кодирует протеин *Bacillus thuringiensis* (B.t.); либо указанная вторая последовательность кодирует

CryIA(b) протеин, либо указанная вторая кодирующая последовательность является маркерным геном.

Изобретение также относится к

а) Нуклеотидной последовательности, обеспечивающей направленную предпочтительную для сердцевин стебля экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, и содержащей последовательность ДНК, представленную на фиг.24, и

б) нуклеотидной последовательности, обеспечивающей специфическую для пыльцы экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, и содержащей последовательность ДНК, представленную на фиг.35.

Изобретение относится к рекомбинантной молекуле ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность а) или б), операбельно связанную со структурным геном, кодирующим протеин насекомых.

При этом в вышеуказанной рекомбинантной молекуле ДНК указанный структурный ген представляет собой последовательность, которая кодирует инсектицидный протеин, как указано выше.

Изобретение также относится к способу получения оптимизированной для кукурузы кодирующей последовательности инсектицидного протеина, которая представлена последовательностью, выбранной из группы последовательностей, включающих SEQ ID Nos 2,3,4 или из группы последовательностей, приведенных на фиг. 6, 7, 9, 11, 13, 15, либо последовательности, кодирующей CryIA(b) протеин, который термостабилен по сравнению с нативным CryIA(b) протеином, и выбранным из группы последовательностей, представленных на фиг. 9, 11, 13, 15, а также последовательностей, представленных на фиг. 6, 3, 4, 7.

Способ включает обнаружение аминокислотной последовательности заранее определенного инсектицидного протеина и изменение кодирующей последовательности протеина за счет замены соответствующих нативных кодонов на кодоны, которые наиболее предпочтительны для кукурузы.

Изобретение также относится к способу защиты растений кукурузы по меньшей мере от одного насекомого вредителя, включающему стабильную трансформацию растения кукурузы по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, указанной выше, или рекомбинантной молекулой ДНК,

указанной выше, где кодирующая последовательность кодирует инсектицидный протеин; за счет чего трансформированное растение кукурузы экспрессирует инсектицидный протеин в количестве, достаточном для защиты растения от насекомых-вредителей.

Предпочтительно инсектицидный протеин экспрессируется в количестве, достаточном для борьбы с чешуекрылыми или жесткокрылыми насекомыми-вредителями.

Как правило, инсектицидный протеин экспрессируется в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми, выбранными из группы, состоящей из мотылька кукурузного, огневки сахарного тростника, совки, бабочки, походных червей, листосдов, проволочника и тлей.

Предпочтительно указанный инсектицидный протеин является протеином Vt, в частности является CryIA(b) протеином, а указанный промотор является ткане-специфическим или ткане-предпочтительным.

Изобретение относится к способу защиты растений кукурузы по меньшей мере от одного насекомого-вредителя, включающему стабильную трансформацию растений кукурузы нуклеотидной последовательностью, содержащей оптимизированную для кукурузы кодирующую последовательность инсектицидного протеина, где указанный протеин экспрессируется в указанном трансформированном растении в количестве по меньшей мере в 100 раз большем, чем он экспрессируется при использовании нативных кодонов.

В соответствии с настоящим изобретением были синтезированы Vt гены для инсектицидных кристаллических протеинов, в которых используемый кодон изменен для повышения экспрессии в растениях, в частности, в кукурузе. Однако, вместо того, чтобы изменять частоту использования кодонов для "сборки" гена кукурузы с точки зрения полного распределения кодонов, осуществили оптимизацию использования кодона, используя кодоны, которые наиболее предпочтительны для кукурузы при синтезе гена. Использование оптимизированных для кукурузы предпочтительных кодонов эффективно для высокого уровня экспрессии Vt инсектицидного протеина. Это может быть результатом максимизации количества Vt инсектицидного протеина, транслированного из мРНК данной популяции. Синтез Vt IP гена с

использованием предпочтительных для кукурузы кодонов также имеет тенденцию исключить случайные сайты процессинга, которые могли бы находиться в нативной кодирующей последовательности. Экспрессия такого синтетического гена существенно выше, в клетках кукурузы, нежели экспрессия нативного IP Bt гена.

Предпочтительные синтетические, оптимизированные для кукурузы ДНК последовательности настоящего изобретения происходят от протеинов, кодируемых cryIA(b) геном в *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, HD-1; Geiser et al., Gene, 48: 109-118 (1986) или cryIB гена (АКА Crya4 гена), описанного Brizzard и Whiteley, Nuc. Acids. Res., 16: 2723 (1988). ДНК последовательность нативного *kurstaki* HD-1 cryIA(b) гена представлена как последовательность 1. Эти протеины подавляют различные чешуекрылые насекомые, включая *Ostrinia nubilalis*, европейского мотылька кукурузного.

Хотя настоящее изобретение ограничено примерами синтеза оптимизированных для кукурузы Bt протеиновых генов, следует учитывать, что этот способ может быть использован для оптимизации экспрессии любого протеина в растениях.

Рассматриваемые оптимизированные гены можно слить с различными промоторами, включая конститутивные, индуцируемые, регулируемые во времени, регулируемые при развитии, ткане-предпочтительные и ткане-специфические промоторы, для получения рекомбинантных ДНК молекул, например, химерных генов. Оптимизированный для кукурузы ген (кодирующая последовательность) обеспечивает существенно более высокие уровни экспрессии в трансформированном растении по сравнению с экспрессией неоптимизированного для кукурузы гена. Соответственно, можно получить растения, устойчивые к чешуекрылым или жесткокрылым вредителям, таким как мотылек кукурузный и огневка сахарного тростника.

Другой целью настоящего изобретения является создание ткане-предпочтительных и ткане-специфических промоторов, которые управляют экспрессией и оперативно связаны с представляющими интерес структурным геном в специфической части или частях растения, практически исключая другие части.

Изобретение позволяет создать предпочтительные для сердцевины промоторы. Под "предпочтительными для сердцевины" подразумевают промоторы, способные управлять экспрессией операбельно связанного структурного гена, главным образом, в сердцевине стебля растения, а не в его корнях, не во внешней оболочке и в опорных корнях, и по существу без экспрессии в семенах, а также специфические для пыльцы промоторы. Под "специфическими для пыльцы" промоторами подразумевают промоторы, способные управлять экспрессией оперативно связанного структурного гена, представляющего интерес, практически исключительно в пыльце растения, по существу без экспрессии в любых других частях растения.

Еще одной целью настоящего изобретения является создание рекомбинантных ДНК молекул, содержащих ткане-предпочтительный промотор или ткане-специфический промотор, операбельно связанный или ассоциированный с представляющим интерес структурным геном, особенно структурным геном, кодирующим инсектицидный протеин, и обеспечение экспрессии рекомбинантной молекулы в растениях.

Еще одной целью настоящего изобретения является создание трансгенных растений, которые экспрессируют, по крайней мере, один представляющий интерес структурный ген путем ткане-предпочтительной или ткане-специфичной экспрессии.

В специфическом варианте изобретения ткане-предпочтительный или ткане-специфичный промотор операбельно связан со структурным геном, кодирующим инсектицидный протеин, и растение стабильно трансформировано, по крайней мере, одной такой рекомбинантной молекулой. Полученное в результате растение оказывается устойчивым к конкретным насекомым, которые питаются теми частями растения, в которых этот ген (гены) экспрессирован (экспрессированы). Предпочтительные структурные гены кодируют B.t. инсектицидные протеины. Более предпочтительны оптимизированные B.t. IP гены.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 представлено сравнение полной длины нативного Bt cryIA(b) гена (BTHKURHD), полной длины синтетического оптимизированного для кукурузы

Bt cryIA(b) гена (flsynbt.fin) и усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы Bt cryIA(b) гена (bssyn). Из фигуры видно, что последовательность полной длины синтетического оптимизированного для кукурузы cryIA(b) гена соответствует нативному cryIA(b) гену в около 2354 из 3468 нуклеотидах (приблизительно 68% гомологии).

На фиг.2 представлено сравнение усеченного нативного Bt cryIA(b) гена (BTHKURHD) и усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы Bt гена (bssyn). Из фигуры видно, что последовательность усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы cryIA(b) гена соответствует последовательности нативного cryIA(b) гена для около 1278 из 1947 нуклеотидов (приблизительно 66% гомологии).

На фиг.3 представлено сравнение чистой оптимизированной для кукурузы Bt генной последовательности (synlT.mze) с усеченным синтетическим оптимизированным Bt геном (bssyn) и полной длины синтетическим оптимизированным для кукурузы Bt геном, модифицированным так, чтобы он включал сайты рестрикции для облегчения конструирования гена (synful.mod). Из фигуры видно, что усеченная синтетическая оптимизированная для кукурузы cryIA(b) генная последовательность соответствует последовательности чистого оптимизированного cryIA(b) гена для 1913 из 1947 нуклеотидов (приблизительно 98% гомологии).

На фиг.4 представлено сравнение нативного усеченного Bt cryIA(b) гена (BTHKURHD) с усеченным синтетическим cryIA(b) геном, описанным Perlak et al., PNAS USA, 88: 3324-3328 (1991) (PMONBT) и с усеченным синтетическим оптимизированным для кукурузы Bt геном (bssyn). Из фигуры видно, что последовательность PMONBT гена соответствует последовательности нативного cryIA(b) гена для 1453 из 1845 нуклеотидов (приблизительно 79% гомологичности), тогда как усеченный синтетический оптимизированный для кукурузы Bt cryIA(b) ген соответствует нативному cryIA(b) гену для около 1209 из 1845 нуклеотидов (приблизительно 66% гомологичности).

На фиг.5 представлено сравнение усеченного синтетического cryIA(b) гена, описанного Perlak et al., PNAS USA, 88: 3324-3328 (1991) (PMONBT) и усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы Bt cryIA(b) гена

(bssyn). Из фигуры видно, что PMONBT генная последовательность соответствует последовательности усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы Bt cryIA(b) гена для около 1410 из 1845 нуклеотидов (приблизительно 77% гомологичности).

На фиг.6 представлен полной длины оптимизированный CryIB ген кукурузы.

На фиг.7 представлена полной длины, гибридная, частично оптимизированная для кукурузы, ДНК последовательность CryIA(b) гена, которая содержится в pCIB4434. Синтетический участок состоит из 1-1938 нуклеотидов (аминокислоты 1-646), а нативный участок состоит из 1939-3468 нуклеотидов (аминокислоты 647-1155). Точка слияния синтетической и нативной кодирующей последовательности указана в последовательности штрихом (/).

Фиг.8 представляет собой карту pCIB4434.

Фиг.9 представляет полной длины, гибридную оптимизированную для кукурузы ДНК последовательность, кодирующую термостабильный CryIA(b) протеин, содержащийся в pCIB5511.

Фиг.10 представляет собой карту pCIB5511.

Фиг.11 представляет собой полной длины гибридную оптимизированную для кукурузы ДНК последовательность, кодирующую термостабильный CryIA(b) протеин, содержащийся в pCIB5512.

Фиг.12 представляет собой карту pCIB5512.

Фиг.13 представляет собой полной длины, оптимизированную для кукурузы ДНК последовательность, кодирующую термостабильный CryIA(b) протеин, содержащийся в pCIB5513.

Фиг.14 представляет собой карту pCIB5513.

Фиг.15 представляет собой полной длины оптимизированную для кукурузы ДНК последовательность, кодирующую термостабильный CryIA(b) ген, содержащийся в pCIB5514.

Фиг.16 представляет собой карту pCIB5514.

Фиг.17 представляет собой карту pCIB4418.

Фиг.18 представляет собой карту pCIB4420.

Фиг.19 представляет собой карту pCIB4429.

Фиг.20 представляет собой карту pCIB4431.

Фиг.21 представляет собой карту pCIB4428.

Фиг.22 представляет собой карту pCIB4430.

Фиг.23А представляет собой таблицу, содержащую данные по уровням содержания cryIA(b) протеина в трансгенной кукурузе.

На фиг.23В представлена таблица, в которой суммированы результаты биоанализов Ostrinia и Diatraea на листовом материале от потомства кукурузы, содержащем оптимизированный для кукурузы CryIA(b) ген.

На фиг.23С представлена таблица, содержащая данные уровней содержания cryIA(b) протеина в трансгенной кукурузе.

На фиг.23D представлена таблица, в которой суммированы результаты биоанализа Ostrinia и Diatraea на листовом материале от кукурузного потомства, содержащего синтетический Vt кукурузный ген, операбельно связанный с промотором сердцевинны.

На фиг.23Е представлена таблица, содержащая данные по экспрессии cryIA(b) гена в трансгенной кукурузе, полученные с сердцевинно-предпочтительным для сердцевинны промотором.

На фиг.24 представлена полная геномная ДНК последовательность кукурузного гена α -субъединицы триптофан синтазы. Показаны интроны, экзоны, области начала транскрипции и трансляции, старт- и стоп-области кДНК. S = начало и конец кДНК; +1 = начало транскрипции; 73***** = праймер удлинения праймера; +1 = начало трансляции; + + + = стоп-кодон; п.о. 1495-99 = ССААТ блок; п.о. 1593-1598 = ТАТАА блок; п.о. 3720-3725 = сайт полиаденирования; # над подчеркнутыми последовательностями относится к PCR.

На фиг.25А, 25В, 25С и 25D представлены результаты Нозерн-блоттинга, где показана дифференциальная экспрессия гена субъединицы TgrA кукурузы в тканях кукурузы спустя 2 часа, 4 часа, 18 часов и 48 часов, соответственно, при -80°С с интенсифицирующими экранами Du Pont Cronex. Р = сердцевина; С = кочерыжка початка; ВR = опорный корень; Е = нижняя часть початка; LP = нижняя часть сердцевинны; МР = средняя часть сердцевинны; UP = верхняя часть

сердцевины; S = семена; L = листья; R = корень; и P (вверху слева) = вся сердцевина.

Фиг.26 представляет результаты Нозерн-блоттинга, две левые линии которого демонстрируют экспрессию TgrA гена в листьях (L) и сердцевине (P) Funk инбредных линий 211D и 5N984. Пять правых линий показывают отсутствие экспрессии полной РНК в зернах Funk 211D. S(1, 2, 3, 4 и 5) = зерна спустя 1, 2, 3, 4 и 5 недель после опыления. L = лист; P = сердцевина; S# = зерна спустя # недель после опыления.

Фиг.27 изображает результаты Саузерн-блоттинга геномной ДНК Funk линии 211D при гибридизации с кукурузной TgrA кДНК 8-2 (pCIB5600), где B обозначает BamHI, E обозначает EcoRI, EV обозначает EcoRV, H обозначает HINDIII, а S обозначает SacI. 1X, 5X и 10X обозначают эквиваленты реконструированных генных копий.

Фиг.28А представляет анализ удлинения праймера, который демонстрирует начало транскрипции кукурузного TgrA субъединичного гена и лестницу секвенирования. Линия +1 и +2 соответствует 1X + 0,5X образцам реакции удлинения праймера.

Фиг.28В представляет анализ защиты РНказы от +2 т.п.о. до +387 т.п.о. при температурах отжига 42°С, 48°С и 54°С при 16 часах экспонирования пленки при -80°С с интенсифицирующими экранами Du Pont Cronex.

Фиг.29 представляет собой карту исходного Типа II специфичного для пыльцы кДНК клона. Проиллюстрировано субклонирование трех EcoRI фрагментов в pBluescript векторы для создания pCIB3168, pCIB169 и II-0,6.

Фиг.30 представляет ДНК последовательность кДНК гена специфичной для пыльцы кальций-зависимой протеинкиназы гена кукурузы, содержащейся в 1,0 и 0,5 т.п.о. фрагментах клона кДНК исходного типа II EcoRI сайт, который делит 1,0 т.п.о. и 0,5 т.п.о. фрагменты, указан. Эта кДНК - неполной длины, так как сайт начала мРНК расположен на 490 п.о. в обратном направлении от конца кДНК-клона.

Фиг.31 иллюстрирует ткане-специфическую экспрессию СДРК мРНК пыльцы. РНК из указанных тканей 211D кукурузы денатурируют, обрабатывают

электрофоретически на агарозном геле, переносят на нитроцеллюлозу и зондируют 0,5 т.п.о. Фрагментом кДНК СДРК пыльцы мРНК детектируется только в пыльце, где виден сильный сигнал.

Фиг.32 представляет собой сравнение аминокислотных последовательностей последовательности протеина, полученного из пыльцы СДРК, и последовательности протеина протеинкиназы 2 крысы, раскрытой Tobimatsu et al., J. Biol. Chem. 263: 16082-16086 (1988). Программа Align DNASTar программного обеспечения была использована для оценки этих последовательностей. Гомология с протеинкиназой наблюдается в двух третях 5'-конца гена, то есть, на фрагменте 1,0 т.п.о.

Фиг.33 представляет собой сравнение аминокислотных последовательностей последовательности протеина СДРВ пыльцы и последовательности протеина калмодулина человека, раскрытой Fischer et al., J. Biol. Chem. 263: 17055-17062 (1988). Гомология по отношению к калмодулину в одной трети 3'-конца гена, то есть во фрагменте 0,5 т.п.о.

Фиг.34 представляет собой сравнение аминокислотных последовательностей протеина, полученного из СДРК пыльцы и СДРК сои. Гомология охватывает полный ген.

Фиг.35 иллюстрирует последовательность специфичного для пыльцы гена СДРК кукурузы. 1,4 т.п.о. последовательность перед сайтом начала мРНК показана. Положения семи экзонов и шести интронов обозначены под соответствующей ДНК последовательностью. Указаны сайты полиаденилирования в кДНК клоне.

Фиг.36 является картой pCIB4433.

Фиг.37 является полной длины гибридной, оптимизированной для кукурузы ДНК последовательностью, кодирующей термостабильный cryIA(b) протеин.

Фиг.38 является картой pCIB5515.

Описание последовательностей

Последовательность 1 представляет собой ДНК последовательность полной длины нативного Vt cryIA(b) гена.

Последовательность 2 представляет собой ДНК последовательность полной длины чистого оптимизированного для кукурузы синтетического Bt cryIA(b) гена.

Последовательность 3 представляет собой ДНК последовательность приблизительно 2 т.п.о. усеченного синтетического оптимизированного для кукурузы Bt cryIA(b) гена.

Последовательность 4 представляет собой ДНК последовательность полной длины синтетического оптимизированного для кукурузы Bt cryIA(b) гена.

Последовательность 5 представляет собой ДНК последовательность приблизительно 2 т.п.о. синтетического Bt гена по Perlak et al.

Подробное описание изобретения

Для разъяснения используемых в рассматриваемом изобретении и в формуле изобретения терминов приводятся следующие разъяснения.

Предпочтительный кукурузный кодон: Предпочтительный кодон означает предпочтительность, демонстрируемую специфическими клетками хозяина в использовании нуклеотидных кодонов для определения данной аминокислоты. Предпочтительный кодон для аминокислоты для конкретного хозяина является единственным кодоном, который наиболее часто кодирует эту аминокислоту в этом хозяине. Предпочтительный для кукурузы кодон для конкретной аминокислоты может быть получен из известных генных последовательностей кукурузы. Так, например, частота использования в кукурузе кодона для 28 генов из растений кукурузы перечислена в таблице 4 Murray et al., Nucleic Acids Research, 17: 477-498 (1989), раскрытие которой включено сюда в качестве ссылки. Так, например, предпочтительным для кукурузы кодоном для аланина является GCC, так как в соответствии с пулом последовательностей 26 кукурузных генов в работе Murray et al., ранее, этот кодон кодирует аланин в 36% случаев, тогда как GCG (24%), GCA (13%) и GCT (27%).

Чистая оптимизированная для кукурузы последовательность: оптимизированный ген или ДНК последовательность относится к гену, в котором нуклеотидная последовательность нативного гена была модифицирована для использования предпочтительных кодонов для кукурузы. Так, например, синтетический оптимизированный для кукурузы Bt cryIA(b) ген представляет собой ген, в

котором нуклеотидная последовательность нативного Bt cryIA(b) гена была модифицирована таким образом, что использованные кодоны представляют собой предпочтительные для кукурузы кодоны, в том смысле, как было указано ранее. Чистый оптимизированный для кукурузы ген представляет собой такой ген, в котором нуклеотидная последовательность составляет 100% предпочтительных для кукурузы последовательностей кодонов для конкретного полипептида. Так, например, чистый оптимизированный для кукурузы Bt cryIA(b) ген представляет собой такой ген, в котором нуклеотидная последовательность составляет 100% предпочтительных для кукурузы последовательностей и кодирует полипептид с той же аминокислотной последовательностью, что и та, которую продуцирует нативный Bt cryIA(b) ген. Чистая нуклеотидная последовательность оптимизированного гена может быть изменена для облегчения манипуляции с геном, например, может быть изменен нуклеотид для создания или исключения рестрикционных сайтов. Чистая нуклеотидная последовательность оптимизированного гена может быть также изменена для исключения потенциально вредных сайтов процессинга, например, сайтов потенциального полиаденилирования или сайтов распознавания интронов.

Следует учитывать, что могут быть также использованы "частично оптимизированные для кукурузы" последовательности. Под частично оптимизированными для кукурузы подразумевают, что кодирующий участок гена является химерным (гибридным), причем состоит из последовательностей, полученных из нативного инсектицидного гена и последовательностей, которые были оптимизированы для экспрессии в кукурузе. Частично оптимизированный ген экспрессирует инсектицидный протеин на уровне, достаточном для борьбы с насекомыми-вредителями, и эта экспрессия гораздо выше, нежели экспрессия, которой достигают при использовании только нативных последовательностей. Частично оптимизированные для кукурузы последовательности включают такие, которые содержат, по крайней мере, около 5% оптимизированных последовательностей.

Полной длины Bt гены: относится к ДНК последовательностям, содержащим полную нуклеотидную последовательность, необходимую для кодирования полипептида, продуцируемого нативным Bt геном. Так, например,

нативный Vt cguIA(b) ген имеет длину приблизительно 3,5 т.п.о. и кодирует полипептид, который имеет длину приблизительно 1150 аминокислот. Полной длины синтетический cguIA(b) Vt ген должен быть, по крайней мере, приблизительно 3,5 т.п.о. длины.

Усеченные Vt гены: относится к ДНК последовательностям, состоящим из менее, чем полной нуклеотидной последовательности, необходимой для кодирования полипептида, продуцируемого нативным Vt геном, но которая кодирует участок активного токсина полипептида, так что протеиновый продукт обладает инсектицидной активностью.

Ткане-предпочтительный промотор: термин "ткане-предпочтительный промотор" используют для обозначения того, что данная регуляторная ДНК последовательность будет обеспечивать более высокий уровень транскрипции связанного структурного гена или ДНК кодирующей последовательности, или экспрессии продукта соответствующего гена, по данным любого обычного РНК или протеинового анализа, или что данная ДНК последовательность будет демонстрировать некоторый дифференцированный эффект; то есть, что транскрипция соответствующих ДНК последовательностей или экспрессия генного продукта выше в некоторых тканях, нежели во всех остальных тканях растения.

"Ткане-специфический промотор" используют для обозначения того, что данная регуляторная ДНК последовательность будет обеспечивать транскрипцию соответствующей кодирующей ДНК последовательности, по существу полностью в одной или более тканях растения, или в одном типе ткани, например, в зеленых тканях, и при этом практически не будет транскрипции этой соответствующей кодирующей ДНК последовательности во всех других тканях или типах тканей растения.

В настоящем изобретении предложены ДНК последовательности, оптимизированные для экспрессии в растениях, особенно в растениях кукурузы. В предпочтительном варианте настоящего изобретения ДНК последовательность, кодирующая инсектицидный токсин, предпочтительно полипептид, имеющий по существу аминокислотную последовательность инсектицидного кристаллического протеинового токсина, обычно продуцируемого *Bacillus thuringiensis*. Синтетический ген может кодировать усеченный или полной длины

инсектицидный протеин. Наиболее предпочтительны синтетические ДНК последовательности, которые кодируют полипептид, эффективный против насекомых отряда чешуекрылых и жесткокрылых, и синтетические ДНК последовательности, которые кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью практически той же, что и у кристаллического протеинового токсина Bacillus thuringiensis variety kurstaki, HD-1.

В настоящем изобретении предложены синтетические ДНК последовательности, эффективные для достижения высокой экспрессии активных инсектицидных протеинов в растениях, предпочтительно в кукурузных протопластах, растительных клетках и растениях. Синтетические ДНК последовательности настоящего изобретения были модифицированы так, чтобы походить на кукурузный ген с точки зрения частоты использования кодона и содержания G + C. В результате этих модификаций синтетические ДНК последовательности настоящего изобретения не содержат потенциальных сайтов процессинга, которые присутствуют в нативном гене. Полученные синтетические ДНК последовательности (синтетические Bt IP кодирующие последовательности) и векторы трансформации растений, содержащие эту синтетическую ДНК последовательность (синтетические Bt IP гены), приводят к неожиданному возрастанию экспрессии синтетического Bt IP гена, по сравнению с нативным Bt IP геном, с точки зрения продуцирования инсектицидного протеина в растениях, особенно в кукурузе. Высокий уровень экспрессии приводит к получению клеток и растений кукурузы, которые демонстрируют устойчивость к чешуекрылым насекомым, предпочтительно к мотыльку кукурузному и Diatrea saccharalis, огневке сахарного тростника.

Синтетические ДНК последовательности настоящего изобретения сконструированы таким образом, чтобы кодировать инсектицидные протеины Bacillus thuringiensis, но оптимизированы для экспрессии в кукурузе с точки зрения содержания G + C и частоты использования кодона. Так, например, таблицу использования кодонов, описанную Murray et al., ранее, используют для обратной трансляции аминокислотной последовательности токсина, продуцируемого Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 cryIA(b) гена, используя только наиболее предпочтительные кукурузные кодоны. Обратно

транслированная ДНК последовательность обозначается как чистая оптимизированная для кукурузы последовательность, и она представлена как последовательность 4. Эта последовательность последовательно модифицирована для исключения нежелательных эндонуклеазных сайтов рестрикции, и для создания необходимых эндонуклеазных сайтов рестрикции. Эти модификации осуществлены для облегчения клонирования гена без изменения частоты использования кодона или оптимизированной для кукурузы последовательности. В процессе клонирования, для облегчения клонирования гена, другие модификации осуществляют на участке, который предположительно особенно предрасположен к ошибкам, возникающим в процессе клонирования за счет полимеразной реакции удлинения цепи (PCR). Окончательная последовательность оптимизированного для кукурузы синтетического Bt IP гена представлена на фиг. как последовательность 2. Сравнение оптимизированного синтетического Bt IP гена с нативным *kurstaki cryIA(b)* геном представлено на фиг.1.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения протеин, продуцируемый синтетической ДНК последовательностью, эффективен против насекомых отряда чешуекрылых и жесткокрылых. В более предпочтительном варианте полипептид, кодируемый синтетической ДНК последовательностью, состоит, в основном, из полной длины или усеченной аминокислотной последовательности инсектицидного протеина обычно продуцируемого *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. В наиболее предпочтительном варианте синтетическая ДНК последовательность кодирует полипептид, состоящий, в основном, из усеченной аминокислотной последовательности Bt CryIA(b) протеина.

Инсектицидные протеины настоящего изобретения экспрессируются в растениях в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми-вредителями, то есть в контролируемых насекомых количествах. Известно, что количество экспрессированного инсектицидного протеина в растения, необходимое для борьбы с насекомыми, может варьировать в зависимости от видов растений, типа насекомых, факторов окружающей среды и т.п. Обычно популяцию насекомых следует поддерживать ниже экономического порога, который меняется от растения к растению. Так, например, для борьбы с мотыльком кукурузным

экономичный для кукурузы порог составляет 0,5 массы яиц/растение, что составляет около 10 личинок на растение.

Способы настоящего изобретения пригодны для борьбы с широким кругом насекомых, включая, но не ограничиваясь ими, листоедов, бабочек, походных червей, особенно совку травяную и совку малую, проволочников, тлей, мотылька кукурузного, точильщика сахарной свеклы, точильщика зернового, юго-западную огневку кукурузную и т.д.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения синтетическая кодирующая ДНК последовательность, оптимизированная для экспрессии в кукурузе, содержит процент G + C выше, нежели процент для нативного cryIA(b) гена. Предпочтительно, чтобы G + C процент составлял, по крайней мере, около 50 %, и более предпочтительно, по крайней мере, около 60 %. Наиболее предпочтительно, чтобы процент G + C составлял около 64 %.

В другом предпочтительном варианте настоящего изобретения синтетическая кодирующая ДНК последовательность, оптимизированная для экспрессии в кукурузе, включает нуклеотидную последовательность, имеющую, по крайней мере, около 90 % гомологии с "чистой" оптимизированной для кукурузы нуклеотидной последовательностью Bacillus thuringiensis cryIA(b) протеина, более предпочтительно, по крайней мере, около 95 % гомологии, и наиболее предпочтительно, по крайней мере, около 98 %.

Другие предпочтительные варианты настоящего изобретения включают синтетические ДНК последовательности, содержащие, главным образом, ДНК последовательность SEQ ID № 4, а также ее мутанты или варианты; векторы трансформации, содержащие, главным образом, ДНК последовательность SEQ ID № 4; и выделенные ДНК последовательности, полученные из плазмид pCIB4406, pCIB4407, pCIB4413, pCIB4414, pCIB4416, pCIB4417, pCIB4418, pCIB4419, pCIB4420, pCIB4421, pCIB4423, pCIB4434, pCIB4429, pCIB4431, pCIB4433. Наиболее предпочтительны выделенные ДНК последовательности, полученные из плазмид pCIB4418, pCIB4420, pCIB4434, pCIB4429, pCIB4431 и pCIB4433.

Для конструирования одной из оптимизированных для кукурузы ДНК последовательностей настоящего изобретения, получают синтетические ДНК

олигонуклеотиды со средней длиной около 80 нуклеотидов. Эти олигонуклеотиды сконструированы для гибридизации для получения фрагментов, содержащих различные черверти усеченного гена токсина. Олигонуклеотиды для данных четвертей гибридизуют и амплифицируют, используя PCR. Затем эти "четвертинки" клонируют и клонированные "четвертинки" секвенируют для определения тех, которые содержат целевые последовательности. В одном случае, в четвертой "четвертинке" гибридизированные олигонуклеотиды клонируют непосредственно без PCR амплификации. После того, как обнаруживают все клоны из четырех "четвертинок", которые содержат открытые рамки считывания, собирают интактный ген, кодирующий активный инсектицидный протеин. Затем собранный ген тестируют на инсектицидную активность против всех представляющих интерес насекомых, включая мотылька кукурузного (ЕСВ) и огневку сахарного тростника. (Примеры 5А и 5В, соответственно). Когда получают полностью функциональный ген, его снова секвенируют для того, чтобы подтвердить его первичную структуру. Было обнаружено, что полностью функциональный ген обеспечивает 100% смертность в биоанализах против ЕСВ. Полностью функциональный ген также модифицируют для экспрессии в кукурузе.

Оптимизированный для кукурузы ген тестируют путем анализа на транзитную экспрессию, например, для кукурузы. Нативная *Vt cryIA(b)* кодирующая последовательность для активного инсектицидного токсина не экспрессируется на детектируемых уровнях в системе транзитной экспрессии для кукурузы. Так, уровень экспрессии синтезированного гена можно определить. Представленными способами можно повысить экспрессию протеина в трансформированном растении, по крайней мере, в 100–50000 раз, более специфично, по крайней мере, в около 1000 раз – около 20000 раз.

Увеличение экспрессии инсектицидного гена до эффективного уровня не требует манипуляций с нативным геном по всей последовательности. Эффективной экспрессии можно достичь, манипулируя только с частью последовательностей, необходимой для достижения повышенной экспрессии. Полной длины оптимизированный для кукурузы *CryIA(b)* ген можно получить, который будет содержать протеин нативной *CryIA(b)* последовательности. Так, например,

фиг.7 иллюстрирует полной длины, оптимизированный для кукурузы CryIA(b) ген, который является синтетически-нативным гибридом. То есть, около 2 т.п.о. гена (нуклеотиды 1-1938) оптимизированы для кукурузы, т.е. является синтетическими. Остальные, С-терминальные нуклеотиды 647-1155, идентичны соответствующей нативной последовательности CryIA(b) гена. Конструирование иллюстративного гена описано в примере 6 далее.

Было обнаружено, что используя описанные здесь способы, можно сконструировать различные синтетические/нативные гибриды и тестировать их на экспрессию. Важным аспектом гибридных конструкций является то, что протеин получают в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми-вредителями. Таким образом, критические участки гена можно идентифицировать, и такие участки синтезируют, используя предпочтительные кодоны. Синтетические последовательности можно связать с нативными последовательностями, как будет показано в примерах далее. Обычно, N-терминальные участки сайтов процессинга можно синтезировать и замещать в нативной кодирующей последовательности для усиления экспрессии в растения.

В другом варианте настоящего изобретения, оптимизированные для кукурузы гены, кодирующие cryIA(b) протеин, можно изменить так, чтобы придать кодируемому протеину большую термостабильность по сравнению с нативным cryIA(b) протеином. Было показано, что cryIA(b) ген, обнаруженный в *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1, имеет делецию из 26 аминокислот при сравнении с cryIA(a) и cryIA(c) протеинами, в -COOH половине протеина. Эта делеция приводит к получению температуро-чувствительного cryIA(b) протеина. См., M.Geiser, EP 0440581, относящийся к термостабильным токсинам *Bacillus thuringiensis*. Репарация этой делеции соответствующим участком из cryIA(a) или cryIA(c) протеина повышает термостабильность репарированного протеина. Конструкции полной длины модифицированного cryIA(b) синтетического гена созданы для включения последовательностей, кодирующих утраченные аминокислоты в соответствующий сайт без изменения рамки считывания и без изменения остальной последовательности протеина. Полной длины синтетическую версию гена собирают за счет синтеза серии двунитевых ДНК кассет, каждая приблизительно в 300 п.о., используя стандартные методики синтеза

ДНК и ферментативные реакции. Репарированный ген кодирует "термоста-
бильный" cryIA(b) белок, так как он сохраняет большую биологическую
активность, нежели его нативный двойник, под действием высоких температур.
Специфические последовательности оптимизированных для кукурузы,
стабильных при нагреве cryIA(b) генов, кодирующих термостабильные
белки, представлены далее на фиг.9, 11, 13 и 15, и также описаны в примере
7 далее.

Настоящее изобретение охватывает оптимизированные для кукурузы
последовательности, кодирующие другие полипептиды, включая другие
инсектицидные полипептиды Bacillus thuringiensis или инсектицидные белки
из других источников. Так, например, cryIB гены можно оптимизировать для
кукурузы, а затем стабильно включить в растения, особенно в кукурузу.
Последовательность оптимизированного для кукурузы cryIB гена в соответствии
с настоящим изобретением представлена далее на фиг.6.

Оптимизация Bt IP гена для экспрессии в кукурузе с использованием
предпочтительного для кукурузы кодона по способу настоящего изобретения,
приводит к существенному повышению экспрессии инсектицидного гена. Можно
предположить, что можно синтезировать и другие гены, используя
предпочтительные для растений кодоны для повышения их экспрессии в
кукурузе или других растениях. Использование предпочтительных для кукурузы
кодонов, по-видимому, является способом оптимизации и максимизации
экспрессии чужеродных генов в кукурузе. Такие гены включают гены, исполь-
зуемые как селективируемые или оценочные маркеры при трансформации
кукурузы, гены, которые придают устойчивость к гербицидам, гены, которые
придают устойчивость к заболеваниям, и другие гены, которые придают
устойчивость к насекомым.

Синтетический cryIA(b) ген также включают в векторы, которые пригодны
для трансформации большого числа растений, относящихся к видам двудольных.
(Пример 44). Растения стабильно трансформируют синтетическими cryIA(b)
векторами, которые демонстрируют инсектицидную активность.

Нативный Bt cryIA(b) ген достаточно богат А + Т. Содержание G + C полной
длины нативного Bt cryIA(b) гена составляет приблизительно 39%. Содержание

G + C усеченного нативного Bt cryIA(b) гена длиной приблизительно 2 т.п.о. составляет приблизительно 37%. Вообще, участки, кодирующие кукурузу, имеют тенденцию быть обогащенными преимущественно G + C. Модификации Bt cryIA(b) гена, приводят к получению синтетического IP кодирующего участка, который содержит более чем 50% G + C, имеет около 65% гомологии на уровне ДНК по сравнению с нативным cryIA(b) геном. Протеин, кодируемый этим синтетическим cryIA(b) геном на 100% гомологичен нативному протеину, и, таким образом, сохраняет полностью функции с точки зрения инсектицидной активности. Усеченный синтетический cryIA(b) ген имеет длину около 2 т.п.о., ген, который кодирует участок активного токсина нативного Bt kurstaki cryIA(b) инсектицидного протеина. Длина протеина, кодируемого усеченным синтетическим cryIA(b) геном, составляет 648 аминокислот.

Синтетические гены настоящего изобретения пригодны для повышенной экспрессии в трансгенные растения, более предпочтительно в трансформированную кукурузу. Трансгенные растения настоящего изобретения можно использовать для экспрессии инсектицидного cryIA(b) протеина с высокими уровнями, что обеспечивает устойчивость к насекомым-вредителям, предпочтительно к жесткокрылым и чешуекрылым насекомым, и наиболее предпочтительно к мотыльку кукурузному (ЕСВ) и к огневке сахарного тростника.

В настоящем изобретении ДНК кодирующая последовательность синтетического оптимизированного для кукурузы гена может быть под контролем таких регуляторных элементов, как промоторы, которые управляют экспрессией кодирующей последовательности. Такие регуляторные элементы, например, включают однодольные, или кукурузные, и другие однодольные функциональные промоторы для обеспечения экспрессии гена в различных частях растения кукурузы. Регуляторный элемент может быть конститутивным. То есть, может быть обеспечена непрерывная и стабильная экспрессия этого гена. Такие промоторы включают, но не ограничиваются ими CaMV 35S промотор; CaMV 19S промотор; A. tumefaciens промоторы, такие как промотор октопинсинтазы, промотор маннопинсинтазы, промотор нопалинсинтазы или другие промоторы опинсинтазы, убикуитиновые промоторы; актиновые промоторы, гистоновые промоторы и тубулиновые промоторы. Регуляторным элементом может быть

ткане-предпочтительный промотор, то есть он может промотировать более высокую экспрессию в некоторых тканях растения по сравнению с другими тканями. Предпочтительно, чтобы ткане-предпочтительный промотор мог управлять более высокой экспрессией синтетического гена в листьях, стеблях, корнях и/или пыльце, нежели в семенах. Регуляторный элемент может также быть индуцируемым, например, тепловым стрессом, водным стрессом, насекомыми или химически, или может регулироваться в процессе развития. Специалистам известно множество промоторов, под контролем которых экспрессия меняется ткане-специфическим образом. Одним из таких примеров является кукурузная фосфоенол-пируват-карбоксилаза (PEPC), которая специфична для зеленых тканей. См., например, Hudspeth R.L. и Grula J.W., Plant Molecular Biology 12: 579-589, 1989). Другие специфичные для зеленой ткани промоторы включают промоторы хлорофилл a/b связывающих протеиновые и промоторы малой субъединицы RubisCO.

В настоящем изобретении предложены также выделенные и очищенные предпочтительные для сердцевин промоторы. Предпочтительные для сердцевин промоторы выделяют из таких злаковых однодольных, как сахарный тростник, рис, пшеница, сорго, ячмень, рожь и кукуруза; более предпочтительны те, которые выделены из растений кукурузы.

В предпочтительном варианте, предпочтительный для сердцевин промотор выделяют из растительного TgrA гена; в наиболее предпочтительном варианте его выделяют из кукурузного TgrA гена. То есть, промотор в его нативном состоянии оперативно связан с кукурузным α -субъединицы геном триптофан-синтазы (здесь и далее "TgrA"). Кодированный белок имеет молекулярную массу около 38 КД. Вместе с другой альфа-субъединицей и двумя бета-субъединицами, TgrA образует мультимерный фермент, триптофансинтазу. Каждая субъединица может функционировать отдельно, но более эффективно они функционируют вместе. TgrA катализирует превращение индолглицеролфосфата в индол. До изобретения заявителей ни кукурузный TgrA ген, ни кодируемый белок не были выделены из какого-либо растения. *Arabidopsis thaliana* триптофансинтазный-бета субъединичный ген был клонирован, как описано у

Wright et al., The Plant Cell, 4: 711-719 (1992). Рассматриваемый кукурузный TrpA ген не гомологичен гену, кодирующему бета-субъединицу.

В настоящем изобретении предложены также очищенные специфичные для пыльцы промоторы, которые можно получить из растительного гена кальций-зависимой фосфаткиназы (СДРК). То есть, в своем нативном состоянии промотор операбельно связан с растительным СДРК геном. В предпочтительном варианте, промотор выделяют из кукурузного СДРК гена. Под термином "специфический для пыльцы" подразумевают, что экспрессия оперативного связанного структурного гена, представляющего интерес практически исключительно (то есть, практически полностью) происходит в пыльце растения, и она ничтожно мала во всех других частях растения. Под "СДРК" подразумевают растительную протеинкиназу, которая имеет высокое сродство к кальцию, но не к кальмодулину, и требует именно кальций, а не кальмодулин для каталитической активности.

Для получения ткане-предпочтительных или ткане-специфических промоторов, можно получить гены, кодирующие ткане-специфическую информацию РНК (мРНК) за счет дифференцированного скринирования кДНК библиотеки. Так, например, предпочтительную для сердцевин кДНК можно получить, подвергая кДНК библиотеку сердцевин дифференцированному скринированию, используя кДНК зонды, получаемые из мРНК сердцевин и семян. См., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook et al., eds. Cold Spring Harbor Press: New York (1989).

В другом варианте, ткане-специфические промоторы можно получить из ткане-специфических протеинов, секвенированием N-концов, синтезируя олигонуклеотидные зонды и используя эти зонды для скринирования кДНК библиотеки. Все эти процедуры представлены в экспериментальном разделе для выделения промоторов специфичных к пыльце.

Объем настоящего изобретения относительно предпочтительных для сердцевин и специфичных для пыльцы промоторов охватывает функционально-активные фрагменты полной длины промотора, который также способен управлять предпочтительной для сердцевин или специфичной для пыльцы транскрипцией, соответственно, связанного структурного гена. Функционально

активные фрагменты промоторной ДНК последовательности можно получить из промоторной ДНК последовательности в результате различных известных специалистам процедур, таких как, например, отщепление промоторной ДНК последовательности с помощью рестриктаз энзимов, синтез в соответствии с последовательностью промоторной ДНК последовательности, или за счет использования PCR технологии. См., например, Mullis et al., Meth. Enzymol. 155: 335-350 (1987); Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press (New York 1989).

Далее, в объем настоящего изобретения включены предпочтительные для сердцевин и специфичные для пыльцы промоторы, "эквивалентные" промоторам полной длины. То есть, могут быть модифицированы различные нуклеотиды или группы нуклеотидов, добавлены или deletированы способами, которые не мешают промоторной активности, в соответствии с известными способами.

Предпочтительный для сердцевин промотор, полученный из гена TgrA кукурузы, представлен на фиг.24. Специалист, имея на руках эту информацию о последовательности, поймет, что предпочтительные для сердцевин промоторы, включенные в объем настоящего изобретения, можно получить из других растений в результате зондирования библиотек из сердцевин этих растений зондами, полученными из структурного гена TgrA кукурузы. Предпочтительны зонды, сконструированные из последовательностей, которые высоко консервативны среди TgrA субъединичных генов различных видов, как будет обсуждаться в примере 17. Другие специфичные для пыльцы промоторы, которые в нативном состоянии связаны с растительными СДРК генами, отличными от кукурузных, можно выделить аналогичным образом, используя зонды, полученные из консервативных участков СДРК гена кукурузы для зондирования библиотек пыльцы.

В другом варианте настоящего изобретения предпочтительный для сердцевин или специфичный для пыльцы промотор операбельно связан с ДНК последовательностью, то есть, структурным геном, кодирующим представляющий интерес протеин, до получения рекомбинантной ДНК молекулы или химерного гена. Фраза "операбельно связанный с" имеет известное специалистам значение; ее можно использовать вместо "оперативно связанный с", "связанный с" или "слитый с".

Структурный ген может быть гомологичен или гетерологичен по отношению к источнику промотора и/или растению, - мишени, в которое его трансформируют. Независимо от происхождения, ассоциированная ДНК последовательность будет экспрессирована в трансформированном растении в соответствии с экспрессионными характеристиками промотора, с которым она связана. То есть, выбор связанной ДНК последовательности должен исходить из желания иметь последовательность, экспрессированную таким образом. Примеры гетерологичных ДНК последовательностей включают те, которые кодируют инсектицидные протеины, например, протеины или полипептиды токсичные или ингибиторные для насекомых или других растительных паразитов-членистоногих, или для таких растительных патогенов, как грибки, бактерии и нематоды. Эти гетерологичные ДНК последовательности кодируют протеины, такие, как ингибиторы протеазы и амилазы, магаининс (Zasloff, PNAS USA, 84:5449-5453 (1987)), секропинс (Hultmark et al., Eur. J. Biochem. 127:207-217 (1982); аттацинс (Hultmark et al., EMBO J. 2:571-576 (1983); мелиттин, грамицидин S (Katsu et al., Biochem. Biophys. Acta, 939:57-63 (1988); натрий протеины и синтетические фрагменты (Oiki et al. PNAS USA, 85:2395-2397 (1988); альфа-токсин Staphylococcus aureus (Tobkes et al., Biochem., 24:1915-1920 (1985); аполипопротеины и их фрагменты, Knott et al., Science 230:37 (1985); Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc., 107:7087 (1985); аламетицин и различные синтетические амфипатические пептиды (Kaiser et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 16:561-581 (1987); лецитин, Lis et al., Ann. Rev. Biochem., 55:35-68 (1986); и инсектицидные протеины из Bacillus thuringiensis, особенно дельта-эндотоксины из B. thuringiensis; и из других бактерий или грибов.

В предпочтительном варианте изобретения предпочтительный для сердцевины промотор, полученный из субъединичного гена TrpA кукурузы или специфичные для пыльцы промотора, полученного из СДРК гена кукурузы, операбельно связан с гетерологичной ДНК последовательностью, кодирующей B. thuringiensis ("B.t.") инсектицидный протеин. Эти протеины и соответствующие структурные гены хорошо известны специалистам. См., Hofte и Whiteley, Microbiol. Reviews, 53: 242-255 (1989).

Хотя известно, что можно использовать любой промотор, способный управлять экспрессией, может оказаться предпочтительным использовать скорее гетерологичные промоторы, а не нативный промотор представляющего интерес протеина. Таким образом, можно сконструировать химерные нуклеотидные последовательности, которые можно определить в зависимости от подлежащего трансформации растения и насекомого-вредителя. Так, например, для борьбы с насекомыми-вредителями кукурузы, промотор однодольных или кукурузы можно операбельно связать с Vt протеином. Этот кукурузный промотор можно выбрать из ткане-предпочтительных и ткане-специфических промоторов, таких как предпочтительные для сердцевин и специфичные для пыльцы промоторы, соответственно, как здесь раскрыто.

В некоторых случаях может оказаться предпочтительным трансформировать растительные клетки более чем одной химической генной конструкцией. Так, например, отдельное растение можно трансформировать предпочтительным для сердцевин промотором, операбельно связанным с Vt протеином. Трансформированные растения будут экспрессировать Vt протеины в сердцевине растения и пыльце, и в меньшей степени в корнях внешней оболочки и в опорном корне.

По ряду других причин, в частности, для обеспечения потенциальной устойчивости к насекомым, которая развивается в растениях с экспрессированными инсектицидными протеинами, выгодно экспрессировать более одного инсектицидного протеина (IP) в одном и том же растении. Можно экспрессировать два различных гена (таких как для различных дельта-эндотоксинов, полученных из *Bacillus thuringiensis*, которые связывают различные рецепторы в среднем кишечнике насекомых - мишеней) в одних и тех же тканях или можно селективно экспрессировать два токсина в различных тканях одного и того же растения, используя ткане-специфические промоторы. Экспрессирование двух Vt генов (или любых двух инсектицидных генов) в одном и том же растении, с использованием трех различных ткане-специфических промоторов создает проблему для получения растения, с целевым фенотипом. Три различных промотора, управляющие двумя различными генами, приведут к получению шести различных инсектицидных генов, которые будет необходимо вводить в растение одновременно. Необходим также для трансформации селектируемый

маркер для идентификации трансформированных растений. Это означает введение семи различных генов в растение одновременно. Более желательно, все гены, особенно инсектицидные гены, интегрировать в геном растения в одном месте, чтобы они вели себя как единый генный признак, а не как множество генных признаков, что будет труднее проследивать при выращивании коммерческих гибридов. Полное число генов можно снизить, используя дифференциальную ткане-специфическую экспрессию различных инсектицидных протеинов.

Так, например, "сливая" *cryIA(b)* с промотором пыльцы и PEP карбоксилазным промотором, можно получить экспрессию этого гена в зеленых тканях и пыльце. "Сливая" предпочтительный для сердцевинки промотор с *cryIB* дельта эндотоксином из *Bacillus thuringiensis* можно обеспечить более интенсивно экспрессию этого инсектицидного протеина в сердцевине трансформированного растения, но не в тканях семян. Трансформация растения этими тремя генами, PEP карбоксилаза/*cryIA(b)*, пыльца/*cryIA(b)* и сердцевина/*cryIB* обеспечивает получение растения, экспрессирующего два различных Vt инсектицидных эндотоксина в различных тканях одного и того же растения. *CryIA(b)* будет экспрессироваться во "внешних" тканях растения (особенно кукурузы), то есть, в тех тканях, которыми питается мотылек кукурузный (ЕСВ) сразу после вылупления. Если бы ЕСВ оказался устойчивым к *cryIA(b)* и был способен пробраться в стебель растения и питаться им после того, как питался тканями листа и/или пыльцой, тогда он подвергнулся бы действию *cryIB* дельта-эндотоксина, второго инсектицидного компонента. Таким образом, можно дифференцированно экспрессировать два различных инсектицидных компонента в одно и то же растение, и снизить полное количество генов, необходимое для введения одной генетической единицы, обеспечивая в то же самое время защиту против развития устойчивости к одному инсектицидному компоненту.

Аналогично, растение можно трансформировать конструкцией, которая кодирует более одного типа инсектицидного протеина для борьбы с различными насекомыми. Так, специалисты могут сконструировать множество вариантов таких конструкций.

Рекомбинантные ДНК молекулы настоящего изобретения можно получить, манипулируя с различными элементами для того, чтобы поместить их в нужной ориентации. Так, можно использовать адапторы или линкеры для соединения ДНК фрагментов. Другие манипуляции можно также осуществлять для обеспечения обычных рестрикционных сайтов, удаления рестрикционных сайтов или избыточных ДНК. Эти манипуляции можно осуществлять известными специалистам способами. См., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 1989. Так, например, такие способы, как рестрикция, "подъедание" или заполнение выступающих концов для создания тупых концов, лигирование линкеров, комплементарных концов ДНК фрагментов, можно обеспечить соединение и лигирование. См., Sambrook et al., ранее.

Можно включить и другие функциональные ДНК последовательности в рекомбинантную ДНК молекулу, в зависимости от того способа, каким эту молекулу следует включать в растительный геном – мишень. Так, например, в случае трансформации, связанной с Agrobacterium, если Ti- или Ri-плазмиды используют для трансформации растительных клеток, правая или левая границы T-ДНК Ti- и Ri-плазмид будут соединены как фланкирующие участки, с кассетой экспрессии. Осуществляемая за счет Agrobacterium tumefaciens трансформация растений была описана Horsch et al., *Science*, 225: 1229 (1985); Marton, *Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants*, 1: 514-521 (1984); Hoekema, в: *The Binary Plant Vector System* Offset-Drukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, 1985, Chapter V Fraley, et al., *Crit. Rev. Plant Sci.*, 4: 1-46; и An et al., *EMBO J.*, 4: 277-284 (1985).

Рекомбинантные ДНК молекулы настоящего изобретения могут также содержать маркерный ген для облегчения отбора в рекомбинантных растительных клетках. Примеры маркеров включают устойчивость к таким биоцидам, как антибиотики, например, к канамицину, гигромицину, хлорамфениколу, парамомоцину, метотрексату и блеомицину, или таким гербицидам, как имидазолон, сульфонилмочевина, глифосат, фосфинотрисин или биалафос. Маркерные гены хорошо известны специалистам.

В другом варианте настоящего изобретения предложены растения стабильно трансформированные рекомбинантной ДНК молекулой или химерным геном, как описано далее. Полученное трансгенное растение содержит трансформированный ген, стабильно включенный в его геном, и экспрессирует структурный ген, операбельно связанный с промотором соответствующим образом.

Трансгенные растения, охватываемые настоящим изобретением, включают как однодольные, так и двудольные растения. Представленные примеры включают кукурузу, табак, томаты, хлопок, рапс, сою, пшеницу, рис, люцерну, картофель и подсолнечник. Предпочтительные растения включают кукурузу, особенно инбредные растения кукурузы.

Все трансформированные растения, охватываемые настоящим изобретением, можно получить несколькими известными специалистам способами. Осуществляемая за счет *A. tumefaciens* трансформация раскрыта ранее. Другие способы включают непосредственный перенос гена в протопласты, Paszkowski et al., EMBO J., 12: 2717 (1984); Loerz et al., Mol. Gen. & Genet., 1199: 178 (1985); Fromm et al., Nature 319: 719 (1986); микробомбардировку, Klein et al., Bio/Technology, 6: 559-563 (1988); введение в протопласты, культивирование клеток и тканей, Reich et al., Bio/Technology, 4: 1001-1004 (1986); или введение в меристемные ткани или проростки растений, как описано De La Pena et al., Nature, 325: 274-276 (1987); Graves et al., Plant Mol. Biol., 7: 43-50 (1986); Hooykaas-Van Slogteren et al., Nature, 311: 763-764 (1984); Grimsley et al., Bio/Technology, 6: 185 (1988); и Grimsley et al., Nature, 325: 177 (1988); и электропорацию WO92/09696.

Экспрессия структурного гена, оперативно связанного с ткане-предпочтительным или ткане-специфическим промотором в трансформированном растении, является критической в том случае, если структурный ген кодирует инсектицидный протеин. Так, например, предпочтительная для сердцевины экспрессия позволяет трансгенному растению быть резистентным к патогенам, которые атакуют преимущественно сердцевину, но также и опорный корень, внешнюю оболочку и листья растений, так как протеин будет экспрессироваться в меньшей степени, но все же в контролирующем насекомых количествах в этих

частях растений, но в случае обоих типов промоторов, останутся нетронутыми листья и семена растений.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры описывают материалы и способы, используемые для осуществления изобретения. Они приведены только в целях иллюстрации, но не являются ограничительными.

Пример 1: Общие способы

ДНК манипуляции осуществляют, используя стандартные процедуры. Эти процедуры часто можно модифицировать и/или заменить, практически не изменяя при этом результаты. За исключением тех случаев, когда приведены конкретные ссылки, большинство процедур описано в книге Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition, 1989.

Синтез ДНК олигомеров:

ДНК олигомеры, которые содержат от около 20 до около 90, предпочтительно от около 60 до около 80 нуклеотидов в длину, синтезируют, используя ДНК синтезатор Applied Biosystem model 380B и стандартные процедуры. Олигомеры получают, используя модернизированную SSCAF3 цикл на 0,2 мкмоль небольшого размера ABI колонку. Процедуру заканчивают, удаляя тритил, а олигомер извлекают из колонки, используя 380B автоматический цикл отщепления. Затем олигомеры деблокируют в избытке гидроксида аммония (NH_4OH) при 55°C в течение 8-12 часов. Затем олигомеры сушат в испарителе, используя газообразный азот. После завершения олигомеры повторно суспендируют в 0,25-0,5 мл деионизированной воды.

Очистка синтетических олигомеров:

Аликвоты каждого олигомера смешивают с равным объемом смеси синий краситель/формамид с окончательным раствором, содержащим 0,05% бромфенола синего, 0,05% ксилонцианол FF, и 25% формамида. Эту смесь нагревают при 95°C в течение 10 минут до денатурирования олигомеров. Затем образцы наносят на 12% гель полиакриламид-мочевина, содержащий 7М мочевины (Sambrook et al.). После электрофореза, проводимого при 300-400 вольт в течение 3-4 часов с использованием Vertical Slab Gel Unit (Hoefer

Scientific Instruments, San Francisco, CA), используют УФ-оттенение для расположения правильного размера фрагмента в геле, который затем вырезают, используя лезвие бритвы. Очищенный фрагмент геля измельчают и инкубируют в 0,4 М LiCl, 1 мМ EDTA (pH 8) буфера в течение ночи при 37°С.

Любой из двух способов используют для выделения олигомеров из эпителиальных остатков полиакриламидного геля: Gene\X 25 мкМ пористый полиэтиленовый фильтр или Миллипор ультрафри-МС 0,45 мкМ фильтр. Очищенные олигомеры осаждают этанолом, выделяют центрифугированием в микроцентрифуге в течение 20 минут при 4°С, и, наконец, повторно суспендируют в ТЕ (10 мМ трис, 1 мМ EDTA, pH 8,0). Концентрации доводят до 50 нг/мкл основания по данным поглощения на 260 нм.

Определение размеров олигомеров с помощью киназы:

Для проверки размеров некоторых олигомеров на геле для секвенирования используют реакции внесения метки с помощью киназы, используя очищенные синтетические олигомеры для каждого представленного размера: 40-меры, 60-меры, 70-меры, 80-меры и 90-меры. В каждой 20 мкл реакции киназирования используют один пикомоль очищенного олигомера в буфере, состоящем из 7,0 мМ трис, pH 7,5, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ DTT, 50 мкг/мл BSA, 3000 мкКюри (3 пикомоля) ³²P-гамма АТФ, и 8 единиц Т4 полинуклеотидкиназы. Киназную реакцию инкубируют в течение часа при 37°С, с последующей экстракцией фенол/хлороформом и трижды осаждают этанолом с гликогеном по способу Trasy, Prep. Biochem. 11: 251-268 (1981).

Приготавливают две порции геля (одна содержит 1000 срм, а другая содержит 2000 срм) из каждой реакции с 25% формамида, 0,05% бромфенола синего и 0,05% ксилолцианола FF. Обработанные киназой олигомеры кипятят в течение 5 минут перед тем, как помещают на 6% полиакриламид, 7М мочевины секвенирующий гель (BRL Gel Mix TM6, BRL, Gaithersburg, MD). Реакцию секвенирования плазмиды pUC18 проводят на том же геле для получения размеров маркеров.

После электрофореза гель высушивают и экспонируют на диагностической рентгеновской пленке (Kodak, X-OMAT AR). Полученная автордиограмма показывает, что все тестируемые очищенные олигомеры имеют правильные

размеры. Олигомеры, которые не были подвергнуты определению размеров непосредственно на секвенирующем геле, обрабатывают на 6% полиакриламидном, 7М мочевины геле (BRL Gel Mix TM6), используя олигомеры с определенными размерами в качестве маркеров размеров. Вначале все олигомеры денатурируют 25% формамидом при 100°С в течение 5 минут перед тем, как поместить нагель. Подкрашивание полиакриламидного геля этидиумбромидом позволяет визуализировать все олигомеры для определения их размеров.

Гибридизация олигомеров для прямого клонирования:

Подлежащие гибридизации олигомеры собирают вместе (от 1 мкг до 20 мкг полной ДНК) и обрабатывают киназой при 37°С в течение 1 часа в IX Promega лигирующем буфере, содержащем 30 мМ трис-НСl, рН 7,8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT и 1 мМ dATФ. В реакции используют от одной до 20 единиц Т4 полинуклеотид-киназы, в зависимости от полного количества присутствующей ДНК. Реакции киназирования останавливают, помещая реакционную смесь в кипящую водяную баню на 5 минут. Олигомеры, которые образуют 5'-концы гибридизованных молекул, не обрабатывают киназой, но добавляют к обработанным киназой олигомерам вместе с добавлением гибридизационного буфера после нагревания. Собранные олигомеры имеют объем 50-100 мкл с добавленным гибридизационным буфером, который используют для установления окончательной концентрации солей до 100 мМ NaCl, 120 мМ трис, рН 7,5 и 10 мМ MgCl₂. Обработанные и необработанные киназой олигомеры собирают вместе и нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 минут, дают медленно остыть до комнатной температуры примерно за 4 часа. Затем гибридизованные олигомеры экстрагируют смесью фенол/хлороформ, осаждают этанолом и повторно суспендируют в 17 мкл ТЕ (10 мМ трис, 1 мМ EDTA, рН 8,0). Используя эти 17 мкл, проводят реакцию лигирования в окончательном объеме 20 мкл (окончательная концентрация = 30 мМ трис-НСl рН 7,8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 1 мМ АТФ и 3 единицы Т4 ДНК лигазы (Promega, Madison WI). Смесь для лигирования инкубируют в течение около 2 часов при комнатной температуре. Гибридизованные/лигированные фрагменты обычно очищают на 2% гелях перед и/или после разрезания рестрикционными энзимами перед тем,

как клонировать их в векторы. Получают 20 мкл реакционной смеси для лигирования, используя 100 нг–500 нг каждого из фрагментов с приблизительными эквимоллярными количествами ДНК в 30 мМ трис-HCl, pH 7,8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ и 3 ед. T4 ДНК лигазы (Promega, Madison WI). Смеси для лигирования инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов. После лигирования ДНК трансформируют в замороженные компетентные *E. coli* летки обычными способами (Sambrook et al.), и полученные трансформанты отбирают на LB-агаре (Sambrook et al.), содержащем 100 мкг/мл ампициллина (см. далее).

PCR реакции для скринирования клонов в *E. coli*:

E. coli колонии, которые содержат правильные ДНК вставки, идентифицируют, используя PCR (см., Sandhu et al., BioTechniques 7: 689–690 (1989)). С помощью зубочистки колонии соскребают с обрабатывавшейся в течение ночи пластины и добавляют к 20 мкл – 45 мкл PCR реакционной смеси, содержащей около 50 пмолей каждого из праймеров гибридизации (см. пример с использованием праймеров MK23A28 и MK25A28 для выбора ориентации SacII фрагмента в pHYB2#6), 200 мкм до 400 мкм каждого dNTP, и 1X реакционного буфера (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). После кипячения *E. coli*/PCR смеси в бане с кипящей водой в течение 10 минут, добавляют 5 мкл Taq полимеразы (0,5 единиц) (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) в 1X реакционном буфере. Параметры реакции PCR обычно устанавливают следующими: стадия денатурирования 94°С в течение 30 секунд, отжиг при 55°С в течение 45 секунд, удлинение при 72°С в течение 45 секунд, для 30–36 циклов. Продукты PCR реакции обрабатывают на агарозном или Nusieve агарозном (FMC) гелях для определения амплифицированных фрагментов нужного размера.

Лигирование:

Переваренные рестрикционным энзимом фрагменты либо очищают в 1% LGT (агароза с низкой температурой желирования, FMC), 2% Nusieve (FMC), или 0,75% агарозе, используя известные специалистам стандартные методики. ДНК полосы визуализируют этидиумбромидом, и полосы вырезают из гелей бритвенным лезвием. Выделенные из LGT фрагменты лигируют непосредственно

в LGT. 10 мкл каждого из выделенных ДНК фрагментов используют для сборки реакционной смеси лигирования, получая окончательный объем реакционной смеси лигирования около 23 мкл. Вырезанные бритвенным лезвием выделенные полосы геля, содержащие целевые ДНК фрагменты, расплавляют и переносят в 1X лигазный буфер и добавляют 3 единицы T4 ДНК лигазы (Promega), как указано ранее. Фрагменты, выделенные либо из обычной агарозы либо из Nusieve агарозы, очищают от агарозы, используя ультрафри-МС 0,45 мкм фильтры (Millipore) и полученные фрагменты лигируют, как было указано ранее. Реакционную смесь лигирования инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов перед тем, как переносят в замороженные компетентные E. coli клетки стандартными способами (Sambrook et al.).

Трансформации:

Приготавливают замороженные компетентные E. coli клетки штамма DH5альфа или HB101, и трансформируют, используя стандартные способы (Sambrook et al.). E. coli "SURE" компетентные клетки получают от Stratagene (La Jolla, CA). В случае лигирования, проводимого на LGT агарозе, после завершения реакции лигирования, добавляют 50 мМ CaCl₂ до окончательного объема 150 мкл, и полученный раствор нагревают при приблизительно 65°С в течение около 10 минут до полного расплавления агарозы. Затем раствор перемешивают и охлаждают на льду в течение около 10 минут перед добавлением около 200 мкл компетентных клеток, которые перед этим оттаивают на льду. Эту смесь инкубируют в течение 30 минут на льду. Затем полученную смесь подвергают термошоку при 42°С в течение 60 секунд перед охлаждением на льду в течение 2 минут. Затем добавляют 800 мкл SOC среды (200% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, устанавливают до pH 8 с 5н NaOH, 20 мМ MgCl₂:MgSO₄ смеси и 20 мМ глюкозы; Sambrook et al.), и клетки инкубируют при 37°С со встряхиванием в течение около 1 часа перед тем, как помещают на пластины селективной среды. Пластины обычно являются L-агаром (Sambrook et al.), содержащим 100 мкг/мл ампициллина.

Если лигирование проводят в растворе без агарозы, обычно 200 мкл замороженного компетента E. coli клеток (штамма DH5альфа) (BRL,

Gaithersburg, MD или клетки Sure, Stratagene, La Jolla, CA), оттаивают на льду и добавляют 5 мкл лигирующей смеси. Реакционную смесь инкубируют на льду в течение около 45-60 минут, затем клетки подвергают термошоку при 42°С около 90 секунд. После выделения при комнатной температуре в течение около 10 минут, добавляют 800 мкл среды SOC, и затем клетки инкубируют в течение 1 часа при 37°С со встряхиванием, и помещают на вышеуказанные пластины.

При скринировании по вставкам в бета-галактозидазный ген в некоторых стандартных используемых векторах, 200 мкл выделенной трансформационной смеси помещают на LB-агарные пластины, содержащие 0,008% X-gal, 80 мкМ IPTG и 100 мкг/мл ампициллина (Sambrook et al.). Пластины инкубируют при 37°С в течение ночи для того, чтобы обеспечить отбор и рост трансформантов.

Минискринирование ДНК:

Трансформанты из пластин с селективной средой выращивают, и строение их плазмид исследуют и подтверждают, используя стандартные процедуры минискринирования плазмид (Sambrook et al.). Обычно процедуру "кипячения" используют для получения небольших количеств плазмидной ДНК для анализа (Sambrook et al.). В другом варианте, иногда используют обработку ацетатом аммония. Этот способ является модификацией способа, описанного Shing-yi Lee et al., *Biotechniques* 9:676-679 (1990).

1) Инокулируют отдельную бактериальную колонию из ночных селекционных пластин в 5 мл (можно уменьшить до 1 мл) ТВ (Sambrook et al.) среды и выращивают в присутствии соответствующего антибиотика.

2) Инкубируют при 37°С в течение ночи.

3) Собирают 5 мл бактериальных клеток в пластиковую ампулу Oakridge и вращают в течение 5 минут при 5000 об/мин в роторе Sorvall SS-34 при 4°С.

4) Удаляют надосадочную жидкость.

5) Повторно суспендируют осадок в 1 мл лизисного буфера (50 мМ глюкозы, 25 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА и 5 мг/мл лизоцима), вращают в течение 5 секунд и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут.

6) Добавляют 2 мл свежеприготовленного щелочного раствора (0,2 н NaOH, 1% додецилсульфата натрия), тщательно закрывают крышкой, смеси-

вают, переворачивая 5 раз и помещают ампулу в баню с ледяной водой на 5 минут.

7) Добавляют 1,5 мл ледяного 7,5 М ацетата аммония (pH 7,6) к раствору, перемешивают, осторожно переворачивая ампулу 5 раз, и помещают в баню с ледяной водой на 5 минут.

8) Центрифугируют смесь при 9000 об/мин в течение 10 минут.

9) Переносят прозрачную надосадочную жидкость в 15 мл ампулу Correx и добавляют 0,6 объемов изопропанола (приблизительно 2,5 мл). Оставляют отстаиваться при комнатной температуре на 10 минут.

10) Центрифугируют смесь при 9000 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре и сливают надосадочную жидкость.

11) Повторно суспендируют осадок в 300 мкл TE буфера. Добавляют 6 мкл исходного раствора РН-азы А и ТI (получено в виде 200 мкл раствора за счет добавления 180 мкл РН-азы А (3254 ед/мг протеина, 5,6 мг протеина/мл) и 20 мкл РН-азы ТI (481 ед/мкг протеина, 1,2 мг протеина/мл). Эти исходные можно получить от USB (US Biochemical). Переносят в ампулу микроцентрифуги и инкубируют при 37°С в течение 15 минут.

12) Добавляют 75 мкл дистиллированной воды и 10 мкл 7,5М ацетата аммония и инкубируют в бане с ледяной водой в течение 10 минут.

13) Центрифугируют смесь при 14000 об/мин в течение 10 минут в микроцентрифуге Beckman при 4°С.

14) Осаждают, добавляя 2,5 объема 100% EtOH (приблизительно 1 мл) и инкубируют в бане с ледяной водой в течение 10 минут.

15) Вращают со скоростью 14000 об/мин в течение 10 минут в микроцентрифуге.

16) Промывают осадок 70% этанолом (используя 0,5 мл-1 мл). Сухой осадок снова суспендируют в 100 мкл 1X New England Biolabs буфере рестриктазы энзима 4 (20 mM трис-HCl, pH 7,9), 10 mM ацетата магния, 50 mM ацетата калия, 1 mM DTT).

Измеряют концентрацию и проверяют чистоту спектрофотометрически по поглощению при 260 и 280 нм.

Для более быстрого определения того, содержит или нет конкретная колония бактерий рекомбинантную плазмиду, проводят процедуру PCR минискринирования, используя модификацию способа описанного (Sandhu G.S. et al., 1989, BioTechniques, 7: 689-690). Короче, получают следующую смесь:

100 мкл праймерной смеси, указанной ранее, 20 мкМ каждого праймера.,
100 мкл dNTФ смесь (2,5 мМ каждого),
100 мкл 10X AmpliTaq буфера (Perkin-Elmer Cetus, 1X буфер = 10 мМ трис-НСl, рН 8,3, 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂ и 0,01% желатина),
700 мкл деионизированной воды.

20 мкл вышеуказанной смеси помещают в 0,5 мл полипропиленовой PCR ампулы. Трансформированную бактериальную колонию собирают зубочисткой и снова суспендируют в смеси. Ампулу помещают в ванну с кипящей водой на 10 минут, а затем охлаждают до комнатной температуры, перед тем, как добавить 5 мкл смеси, описанной ниже:

265 мкл деионизированной воды,
30 мкл 10X Amplitaq буфера (Perkin-Elmer Cetus, 1X буфер = 10 мМ трис-НСl, рН 8,3, 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂ и 0,01% желатина),
7,5 мкл Таq полимеразы.

Образцы заливают 50 мкл минерального масла и проводят PCR в течение 30 циклов, используя следующие параметры:

денатурируют: 94°С в течение 1 минуты

отжиг: 55°С в течение 1 минуты

удлиняют: 72°С в течение 45 секунд.

После PCR амплификации, 1 мкл красителя (30% глицерина, 0,25% Бромфенола синего, 0,25% ксилोलцианола) добавляют ко всей реакционной среде и 20 мкл смеси помещают на 2% Nusieve, 1% агарозный гель для того, чтобы увидеть, имеется ли PCR продукт ожидаемого размера.

Эту процедуру используют в качестве начала скринирования. Затем проводят последовательные операции для подтверждения структуры плазмиды и ее вставки перед секвенированием.

Пример 2: Амплификация и сборка каждой четверти

Клонирующие фрагменты синтетического Bt cryIA(b) гена:

Конструируют синтетический ген для клонирования в четыре отрезка, каждый из которых представляет примерно четверть гена. Олигомеры для каждой четверти собирают для сборки либо за счет РСТ, гибридизации, либо сочетания гибридизации с последующей PCR амплификацией, как описано всюду. Синтетические четверти собирают вместе перекрывающимися рестрикционными сайтами Aat II, NcoI и Apa I между 1 и 2, 2 и 3, и 3 и 4 четвертями, соответственно. Каждую четверть гена (составляющую около 500 п.о. собирают за счет гибридизации соответствующих олигомеров и амплификации целевого фрагмента с использованием PCR праймеров специфических для концов этой четверти. Два различных набора PCR реакций используют, в которых существует два набора несколько отличающихся праймеров. PCR продукты двух реакций конструируют так, что они оказываются идентичны, за исключением того, что в первой реакции используют дополнительную ААТТ последовательность по 5' концу кодирующего участка, а во второй реакции используют AGCT последовательность по 3' концу данной четверти. Если продукты этих двух реакций для конкретной четверти смешивают (после удаления полимеразы, праймеров и неполных продуктов), денатурируют и затем снова отжигают, определенное отношение (теоретически 50%) отожденного продукта должно иметь негомологичные свешивающиеся концы. Эти концы конструируют таким образом, чтобы они соответствовали "липким концам", образуемым при рестрикционном переваривании EcoRI по 5' концу и Hind III по 3' концу молекулы. Полученные молекулы фосфорилируют, лигируют в EcoRI/HindIII переваренный и фосфорилированный вектор (Bluescript), и трансформируют в замороженный компетентный *E. coli* штамм DH5альфа. После отбора, *E.coli* колонии, содержащие целевой фрагмент идентифицируют по характеру рестрикционного переваривания ДНК. Вставки, представляющие части синтетического гена, затем очищают и секвенируют, используя стандартные процедуры. Во всех случаях, клоны из многочисленных PCR реакций получают и секвенируют. Затем четверти соединяют вместе, используя уникальные сайты рестрикта в местах соединения для получения полного гена.

Затем клонирование четверти идентифицируют в процедурах минискринирования, и полученные генные фрагменты секвенируют. Было обнаружено, что в

последовательности часто вкрадываются ошибки, наиболее вероятно во время PCR амплификации. Для исправления таких ошибок в клонах, которые содержат только несколько таких ошибок, используют гибридные олигомеры.

Гибридные фрагменты обрабатывают рестриктазами и клонируют для замены участка, подвергнувшегося мутации в синтетическом гене.

Гибридные фрагменты в интервале значений от 90 п.о. длиной (например, участок, который заменяет фрагмент между SacII сайтами во второй четверти) до около 350 п.о. 4 четверти фрагмента, который заменяет две PCR индуцированные мутации в 4 четверти гена.

Из-за большого количества ошибок в PCR, конструируют плазмиду, которая позволяет проводить селекцию клонированного генного фрагмента, который содержит открытую рамку считывания. Эту плазмиду конструируют таким образом, что если открытую рамку считывания вводят в сайты клонирования, трансформированная бактерия может расти в присутствии канамицина. Конструирование такого вектора описывается подробно далее. Такая система отбора обеспечивает значительный прогресс, так как позволяет быстро идентифицировать клоны с открытой рамкой считывания без того, чтобы возникла необходимость секвенировать большое количество независимых клонов. Синтетические четверти собирают в различные плазмиды, включая BSSK (Stratagene; La Jolla, Ca), pUC18 (Sambrook et al.), и вектор экспрессии канамицина. Другие подходящие плазмиды, включая плазмиды на базе pUC, известны специалистам, и также могут быть использованы.

Полное секвенирование клонированных фрагментов, вестерн-блоттинг клонированных генных продуктов и биоанализа насекомых с использованием мотылька кукурузного в качестве тестового насекомого обеспечивают проверку того факта, что получены полностью функциональные синтетические Vt cryIA(b) гены.

Конструирование вектора экспрессии канамицина для отбора открытых рамок считывания:

Вектор экспрессии канамицина конструируют для отбора фрагментов синтетического гена, которые содержат открытую рамку считывания.

Конструируют PCR олигомеры, которые позволяют осуществить слияние NPTII

гена из T_n5, начиная с нуклеотида 13 (Reiss et al., EMBO J., 3: 3317-3322 (1984-)), с pUC18 и ввести подходящие рестрикционные сайты, которые позволяют осуществлять клонирование различных синтетических Bt IP фрагментов в рамку с геном канамицина. 88 п.о. 5' олигомер, содержащий полилинкерный участок, очищают на 6% полиакриламидном геле, как было указано ранее для олигомерной PAGE очистки. PCR реакцию проводят фрагментом BglII/SmaI размером 1т.п.о., который содержит NPT II ген, полученный из Tn5. PCR реакционная смесь содержит 100 нг темплата матрицы и 100 пмолей олигомеров KE72A28 и KE74A28 (см. последовательность далее), 200 нМ dNTP и 2,5 уд.ед. Taq полимеразы; все в 50 мкл объема с равным объемом минерального масла, налитого сверху.

Праймеры имеют следующие последовательности:

KE74A28

5' -GCAGATCTGG ATCCATGCAC GCCGTGAAGG GCCCTTCTAG AAGGCCTATC

GATAAAGAGC TCCCCGGGGA TGGATTGCAC GCAGGTTC-3'

KE72A28

5' -GCCGTTAACAT GTCGACTCAG AAGAACTCGT CAAGAAGGCG-3'

Параметры использованных PCR составляют: 94°С в течение 45 секунд, 55°С в течение 45 секунд и 72°С в течение 55 секунд со стадией удлинения 3 в течение 3 секунд; всего 20 циклов. Все PCR реакции проводят в термоциклере Perkin-Elmer Cetus. Амплифицированный PCR продукт содержит 800 п.о. и содержит полилинкерный участок с сайтом начала трансляции с последующими уникальными рестрикционными сайтами, слитыми в рамке с геном канамицина № 13, проходящим через терминатор трансляции. pUC:KM74 является кассетой экспрессии канамицина, которая собрана из BglII/SalI полилинкера фрагмента гена канамицина размером 800 п.о., клонированного в pUCB18 вектор. lac Z промотор позволяет экспрессировать ген канамицина в *E.coli*. pUC:KM74 производные следует вначале культивировать на LB-агарных пластинах, содержащих 100 мкг/мл ампициллина для отбора трансформантов, которые

можно последовательно скринировать на LB-агарных пластинах, содержащих 25 мкг/мл канамицина/IPTG. Синтетические Bt IP фрагменты собирают из каждой четверти в кассете канамицина для проверки клонирования открытой считывающей рамки, содержащей кусочки фрагментов. Первый ЕСВ активный синтетический Bt IP генный фрагмент, pBt:Km № 6 является Bt IP геном, который демонстрирует Km устойчивость. Этот фрагмент, как последовательно устанавливают, содержит мутации в 3 и 4 четвертях, которые позднее репарируют.

Пример 2А: Синтез и клонирование первой четверти синтетического гена (пары оснований 1-550)

Нижеследующие процедуры следуют в порядке клонирования первой четверти синтетической ДНК последовательности, кодирующей синтетический Bt cguIA(b) ген. Те же самые процедуры практически используют для синтеза и клонирования другой четверти, за исключением того, что указано для праймеров и рестрикционных сайтов.

Темплат матрицы для 1 четверти: Смесь равных количеств очищенных олигомеров U1-U7 и L1-L7

PCR праймеры:

В прямом направлении:

PI (a): 5'-GTCGACAAGG ATCCAACAAT GG-3'

PI (b): 5'-AATTGTCGAC AAGGATCCAA CAATGG-3'

Обратные:

P2 (a): 5'-ACACGCTGAC GTCGCGCAGC ACG-3'

P2 (b): 5'-AGCTACACGC TGACGTCGCG CAG-3'

Пара праймеров A1: PI(b) + P2(a)

Пара праймеров A2: PI(a) + PI(b)

PCR реакционная смесь, содержащая олигомеры с первой четвертью синтетического оптимизированного для кукурузы Bt IP гена, имеет следующий вид:

200 нг олиго-смеси (все олигомеры для четверти смешаны в равных количествах в расчете на вес).

10 мкг смеси праймеров (1:1 смесь каждого 20 мкМ; праймеры описаны ранее).

5 мкл 10X PCR буфера

PCR используемый буфер может быть либо

(а) 1X концентрации = 10 мМ KCl, 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 2 мМ MgSO_4 и 0,1% тритон X-100 или

(б) 1X концентрация = 10 мМ трис-HCl, pH 8,3, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,01% вес/объем желатина.

Компоненты смешивают, нагревают в бане с кипящей водой в течение 5 минут и инкубируют при 65°С в течение 10 минут.

Затем добавляют следующие реагенты:

8 мкл dNTФ смеси (окончательная концентрация в реакции = 0,2 мМ для каждого), 5 единиц полимеразы.

Окончательный объем реагентов составляет 50 мкл.

Затем олигомеры инкубируют в течение 3 минут при 72°С, а затем проводят PCR. Реакцию PCR ведут в термоциклере Perkin-Elmer в соответствии со следующей схемой циклов:

цикл денатурирования: 94°С, 1 минута

цикл отжига: 60°С, 1 минута

цикл удлинения: 72°С, 45 секунд (+ 3 секунды на цикл)

количество циклов: 15

После завершения реакции, 10 мкл PCR реакционной смеси помещают на 2% Nusieve-GTG (FMC), 1% агарозный аналитический гель для контроля за реакцией. Остальные 40 мкл используют для клонирования описываемых далее генных фрагментов.

Продукты PCR

Представлены концы двунитевого продукта PCR, соответствующие различным парам праймеров (только верхняя нить).

A1 AATTGTCGAC _____ GCGTGT (554 п.о.) 1 четверть

A2 GTCGAC _____ GCGTGTAGCT (554 п.о.) 1 четверть

Гибридизация

По 40 мкл каждой из PCR реакционных смесей, описанных ранее, очищают, используя колонку хромаспин 400 (Clonetech, Palo Alto, CA) в соответствии с указаниями изготовителей. К реакционной смеси добавляют 5 мкг носителя ДНК перед загрузкой в колонку. (Это проводят для большей части клонирования. Однако, в некоторых реакциях PCR реакционную смесь экстрагируют смесью фенол:хлороформ по известным методикам (Sambrook et al.) для удаления Taq полимеразы, и полученную в PCR ДНК выделяют из водной фазы, используя стандартную процедуру осаждения этанолом). Носитель ДНК не элюируется с PCR созданными фрагментами. А1 и А2 реакционные части для каждой четверти смешивают, нагревают в бане с кипящей водой в течение 10 минут, а затем инкубируют при 65°С в течение ночи. Затем реакционную смесь вынимают из 65° бани и осаждают этанолом с 1 мкл (20 мкг) гликогена, не содержащего нуклеазы (Tracy, Prep. Biochem. 11: 251-268 (1981)), в качестве носителя. Осадок повторно суспендируют в 40 мкл деионизированной воды.

Реакция фосфорилирования

Реакцию фосфорилирования проводят следующим образом:

40 мкл ДНК

2,5 мкл 20 мМ АТФ

0,5 мкл 10X BSA/DTT (1X = 5 мМ DTT, 0,5 мкг/мл BSA)

1,0 мкл 10X полинуклеотидкиназного буфера (1X = 70 мМ трис-НСl),
pH 7,6, 0,1 М KCl, 10 мМ MgCl₂)

2,0 мкл полинуклеотидкиназа (New England Biolabs, 20 единиц).

Инкубирование в течение 2 часов при 37°С.

Затем реакционную смесь экстрагируют один раз 1:1 фенол:хлороформовой смесью, затем один раз хлороформом, и водную фазу осаждают этанолом, обычным способом. Осадок повторно суспендируют в 10 мкл TE.

Рестрикционное переваривание

20 мкг Bluescript вектора (BSSK+, Stratagene, La Jolla, CA)

10 мкл 10X рестрикционного буфера (1X = 20 мМ трис-НСl, pH 8,0, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl)

5 мкл Eco RI (New England Biolabs) 100 единиц

5 мкл Hind III (New England Biolabs) 100 единиц

Окончательный объем 100 мкл.

Инкубирование в течение 3 часов при 37°С.

После завершения реакции смесь экстрагируют равным объемом фенола, насыщенного ТЕ (10 мМ трис-НСl, рН 8,0 и 10 мМ ЕДТА). После центрифугирования водную фазу экстрагируют равным объемом смеси 1:1 (ТЕ насыщенный) фенол:хлороформ ("хлороформ" представляет собой смесь в отношении 24:1 хлороформ:изоамиловый спирт), и, наконец, водную фазу из этой экстракции экстрагируют равным объемом хлороформа. Финальную водную фазу осаждают этанолом (добавляя 10 мкл 3М ацетата натрия и 250 мкл абсолютного этанола, оставляя при 4°С на 10 минут и центрифугируя в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут. Осадок промывают в 70% этаноле и сушат при комнатной температуре в течение 5-10 минут, и снова суспендируют в 10 мкл 10 мМ трис (рН 8,3).

Фосфатазная реакция

Векторную ДНК обычным образом обрабатывают фосфатазой для уменьшения количества колоний, которые были получены, но не представляли интереса. Обычно используют щелочную фосфатазу кишечника телят (Sambrook et al.), но на этой стадии можно также использовать и другие фосфатазные фрагменты.

Типичная фосфатазная реакционная смесь:

90 мкл переваренной ДНК, описанной ранее

10 мкл 10X буфера щелочной фосфатазы кишечника телят (1X = 50 мМ трис-НСl, рН 8,3, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ZnCl₂, 10 мМ спермидина)

1 мкл (1 ед.) щелочной фосфатазы кишечника телят (CIP, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)

Инкубируют при 37°С в течение 1 часа.

Затем ДНК очищают на геле (на 1% агарозном геле с низкой температурой гелеобразования (LGT)) и осадок повторно суспендируют в 50 мкл ТЕ. После электрофореза соответствующую полосу вырезают из геля, используя бритвенное лезвие, плавят при 65°С в течение 5 минут и разбавляют 1:1 ТЕ. Этот раствор экстрагируют дважды фенолом, один раз вышеуказанной смесью

фенол:хлороформ, и один раз хлороформом. Окончательную водную фазу осаждают этанолом и снова суспендируют в ТЕ буфере.

Лигирование:

Для лигирования фрагментов синтетического гена в векторы обычно используют следующие условия:

5 мкл фосфорилированной ДНК вставки

2 мкл обработанного фосфатазой EcoRI/HindIII фрагмент вектора Bluescript нагревают при 65°С в течение 5 минут, затем охлаждают

1 мкл 10X лигазного буфера (1X буфер = 30 мМ трис-НСl, рН 7,8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 1 мМ АТФ)

1 мкл BSA (1 мг/мл)

1 мкл лигазы (3 единицы, Promega, Madison, Wisc.)

Реакционную смесь с лигазой обычно инкубируют при 16°С в течение ночи, или при комнатной температуре в течение 2 часов.

Трансформация:

Трансформацию *E.coli* лигированными ДНК фрагментами осуществляют, используя стандартные процедуры (Sambrook et al.), как было указано ранее.

Идентификация рекомбинантов

Белые или светлоголубые колонии, полученные после ночного инкубирования пластин с трансформантами, отбирают. Плазмиды трансформантов характеризуют, используя стандартные процедуры минискринирования (Sambrook et al.) или, как указано ранее. Обычно используют одну из трех процедур, перечисленных ниже:

(1) способ кипячения минипрепарата ДНК

(2) PCR минискринирование

(3) Минипрепарат ацетата аммония.

Обработка рестриктазами рекомбинантных плазмид, которые, как считают, содержат первую четверть, собирают следующим образом:

(а) BamHI/Aat II перевар: 10 мкл ДНК + 10 мкл 1X буфер 4 рестриктазы New England Biolabs

0,5 мкл Bam HI (10 единиц)

0,5 мкл Aat II (5 единиц).

Инкубируют в течение около 2 часов при 37°С.

Колонии, идентифицированные как имеющие нужный тип рестрикции, далее обрабатывают Pvu II и Bgl II в отдельных реакциях. Только клоны, имеющие нужный характер рестрикции при обработке рестриктазами отбирают далее для секвенирования.

Секвенирование фрагментов клонированного гена:

Секвенирование осуществляют, используя модификацию способа дидеокси терминации цепи Сангера (Sambrook et al.), используя двунитевую ДНК с набором Секвеназы 2 (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

Секвенируют шесть первых четвертичных клонов. Из клонов, которые были секвенированы, только два клон, обозначаемые pQA1 и pQA5, как было обнаружено, содержат только по одной делеции каждый. Эти делеции состоят из одной пары оснований каждая, расположенные в положении 452 в pQA1 и положении 297 в pQA5.

Плазмиду pQA1 используют с pP1-8 (как будет указано далее) для получения первой четверти с ожидаемой последовательностью.

Пример 2В: Синтез и клонирование второй четверти

(пары оснований 531-1050)

Матрица: олигомеры U8-U14 и L8-L14

PCR праймеры:

в прямом направлении:

P3 (a): 5'-GCTGCCGAC GTCAGCGTGT TCGG-3'

P3 (b): 5'-AATTGCTGCC CGACGTCAGC GTG-3'

обратный:

P4 (a): 5'-GGCGTTGCCC ATGCTGCCGT ACAGG-3'

P4 (b): 5'-AGCTGGCGT TGCCCATGGT GCCG-3'

Пара праймеров B1: P3(b) + P4(a)

Пара праймеров B2: P3(a) + P4(b)

PCR продукты

B1 AATTGCTGCC _____ AACGCC (524 п.о.) вторая четверть

B2 GCTGCC _____ AACGCCAGCT (524 п.о.)

Гибридизацию, PCR амплификацию, фракционирование по размерам на колонке, и клонирование этого генного фрагмента в Bluescript, обработанный EcoRI/Hind III, осуществляют, как указано ранее для первой четверти (пример 2А). PCR продукт для этой четверти состоит из 529 п.о., представляющих вторую четверть этого гена (нуклеотиды 531-1050). Трансформацию в замороженные компетентные E.coli клетки (DH5альфа) осуществляют, используя стандартные процедуры, описанные ранее (Sambrook et al.).

Минискринирование pQB клонов:

Приготавливают минипрепарат ДНК в соответствии с вышеописанным и обрабатывают (а) Aat II/Nco I, (b) Pvu II и (с) Bgl I для подтверждения наличия вставки в векторе перед секвенированием.

Секвенирование проводят, как описано ранее, используя способ дидеокси Сангера (Sambrook et al.).

Секвенируют все 13 клонов для этой четверти. Вторая четверть содержит одну или более из делеций между положениями 884 и 887. В большинстве случаев G в положении 884 исключен.

Плазмида pQB5 содержит только одну делецию в положении 884. Этот участок расположен между двумя Sac II сайтами (положения 859 и 949). Коррекция этой делеции описана в примере 3.

Клоны первой половины (1-1050 bp).

Фрагмент для клонирования первой половины (четверти 1 и 2) синтетического гена Vt кукурузы, как один ДНК фрагмент получают за счет обработки рестриктазами продукта PCR реакции, содержащей первую четверть и вторую четверть. Рестрикционную эндонуклеазу Aat II используют для того, чтобы вырезать ДНК (с последующей экстракцией фенолом и осаждением этанолом) в 20 мкл реакционной среды. 15 мкл каждой из обработанных Aat II четвертей смешивают и лигируют (50 мкл объема, добавляя 5 мкл 10х лигазного буфера) 1X = 30 mM трис-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM АТФ), 14 мкл деионизированной воды и 1 мкл T4 ДНК лигазы, 3 единицы, Promega, Madison, WI) при комнатной температуре в течение 2 часов. В результате получают фрагмент около 1 т.п.о. по данным электрофореза на 1% агарозном геле, с использованием стандартных условий (Sambrook et al.) 10 мкл продукта

лигирования амплифицируют с помощью PCR, используя условия, описанные ранее, за исключением того, что проводят только 5 циклов.

Пара праймеров: HA = P1(a) + P4(b)

Пара праймеров: HB = P1(b) + P4(a)

Продукт этой реакции клонируют в Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA), как было указано для отдельных четвертей. Эту процедуру проводят только один раз, то есть все вставки ДНК получают в конкретном участке из одной ПСТ реакции.

36 колоний минискринируют Sal I, обрабатывая рестриктазами и Pvu II. Все, за исключением 4, содержат вставку приблизительно 1 т.п.о., и из них по крайней мере, 20 содержат типа Pvu II фрагмент правильного типа. Восемь из этих клонов отбирают для анализа последовательностей. Один из этих клонов, P1-8, содержит нужную последовательность между Eco RI сайтом (396 п.о.) и Dra III сайтом (640 п.о.). Этот клон используют для получения плазмиды, которая содержит нужную последовательность вплоть до Dra III сайта (640 п.о.) во второй четверти с rQA1 (первая четверть с делецией в положении 452 п.о. описана ранее).

Пример 2С: Клонирование и синтез третьей четверти

(пара оснований 1021-1500)

Мишень: Олигомеры U15-U20 и L15-L21

PCR праймеры:

в прямом направлении:

P5 (a): 5'-TTCCCCCTGT ACGGCACCAT GGGCAACGCC GC-3',

P5 (b): 5'-AATTGTACGG CACCATGGGC AAC-3',

в обратном:

P6 (a): 5'-GAAGCCGGGG CCCTTCACCA CGCTGG-3',

P6 (b): 5'-AGCTGAAGCC GGGGCCCTTC ACC-3',

Пара праймеров C1: P5(b) + P6(a)

Пара праймеров C2: P5(a) + P6(b)

PCR продукт:

C1 AATTGTACGG _____ GGCTTC (475 п.о.), 3 четверть

C2 TTCCCCCTGTACGG _____ GGCTTCAGCT (484 п.о.bp) 3 четверть

PCR реакции, выделение нужного размера ДНК фрагмента на колонке, и лигирование в векторы осуществляют, как указано ранее (пример 2А), используя фрагмент вектора Bluescript Eco RI и Hind III. Продукт PCR приблизительно 479 пар оснований представляет третью четверть синтетического гена (NT 1021-1500).

Трансформация замороженных компетентных клеток *E.coli* штамма DH5альфа, отбор и идентификация трансформантов, изучение трансформантов в процедурах минискринирования, и секвенирование фрагмента синтетического гена в векторе - все описаны ранее.

Минискринирование рQC клонов:

Третью четверть минискринируют, используя стандартные процедуры (Sambrook et al.). Минипрепарат ДНК вырезают в результате обработки (а) Nco I/Apa I и (b) Pvu II. Клоны, содержащие фрагменты нужного типа, секвенируют, используя стандартные процедуры. Всего секвенируют 22 клон третьей четверти. Определяют три основные "горячие точки" делеции в третьей четверти (а) в положении 1083 (b) между положениями 1290-1397 и (с) между положениями 1356-1362. Во всех клонах, за исключением одного, рQC8, постоянно имеется вставка С в положении 1365. Помимо этих мутаций, клоны третьей четверти содержат большое количество других, по-видимому, случайных делеций. Общим фактором для трех "горячих точек" мутаций в третьей четверти является то, что все эти участки фланкированы с каждой стороны последовательностями, которые на около 80% представляют С+G. Другие участки, содержащие 5-9 С-Gs подряд, не затронуты. Олигомеры в U15, U16, U18, L15, L16, L18 и L19 переделывают таким образом, чтобы уменьшить содержание С+G в этих участках. Секвенируют пять клонов каждый из PCR реакции, используя модифицированные олигомеры.

Плазмида рQCN103 имеет нужную последовательность для третьей четверти, за исключением изменений в положении 1326. Это изменение, которое заменяет С на G, приводит к замещению одной аминокислотой (лейцином) исходной (фенилаланина).

Пример 2D: Синтез и клонирование четвертой четверти
(пары оснований 1480-1960)

Четвертую четверть гена получают из клона, который исходно сконструирован так, чтобы содержать третью и четвертую четверти гена. "Вторую половину" синтетического гена получают из PCR реакции для слияния третьей и четвертой четвертей. Эти реакции ведут с PCR праймерами P5(a) и P6(a), описанными ранее, для третьей четверти, и праймерами P7(a) и P8(a), описываемыми далее. Обратный праймер модифицируют путем включения Sac I сайта и кодона терминации. Отдельные реакции для каждой четверти ведут в течение 30 циклов, используя описанные ранее условия. Две четверти соединяют вместе перекрывающимися PCR, и затем обрабатывают рестриктазами Nco I и Sac I. Полученный 953 п.о. фрагмент клонируют направлению в pCIB3054, которая была обработана Nco I/Sac I, и обрабатывают щелочной фосфатазой.

pCIB3054 конструируют за счет включения интрона # 9 PERкарбоксилазы (PERC *ivs* #9) в уникальном Hpa I сайте pCIB246 (подробно описано в примере 4). pCIB246 разрезают Hpa I. и обрабатывают фосфатазой с CIP, используя стандартные процедуры, описанные в примере 2A. PERC *ivs* #9 получают за счет PCR, используя rPER-10 в качестве мишени. rPER-10 является геномным субклоном, содержащим полный ген PER карбоксилазы кукурузы, кодирующий C₄ фотосинтетический фермент, плюс около 2,2 т.п.о. 5'-фланкирующей и 1,8 т.п.о. 3'-фланкирующей ДНК. 10 т.п.о. ДНК встраивают в Hind III сайт pUC18 (Hudspeth et al., Plant Molecular Biology, 12: 576-589 (1989)). В прямом направлении PCR праймер, используемый для получения PERC *ivs* #9, является GTACAAAAACCAGCAACTC, и обратный праймер является CTGCACAAAGTGGAGTAGT. PCR продукт представляет собой 108 п.о. фрагмент, содержащий только PER карбоксилазный интрон #9. PCR реакционную смесь экстрагируют фенолом и хлороформом, осаждают этанолом, фосфорилируют полинуклеотидкиназой и обрабатывают T4 полимеразой для заполнения в 3' добавление, найденное в PCR продуктах (Clark, J.M. Nucleic Acid Research, 16: 9677-9686 (1988)), используя стандартные процедуры. Обработанный киназой продукт имеет тупой конец, и его клонируют в HpaI сайт pCIB246, используя описанные ранее стандартные процедуры.

Амплификация и сборка четвертой четверти

Мишень: U21-U26 и L22-L28

PCR праймеры

в прямом направлении:

P7 (a): 5'-TGCTGAAAGG CCCC GGCTTC ACCGG-3'

обратный:

P8 (a): 5'-ATCATCGATG AGCTCCTACA CCTGATCGAT GTGGTA-3'

Пара праймеров 4: P7(a) + P8(a)

Пара праймеров 3: P5(A) + P6(a)

Пары праймеров для перекрывающейся PCR: P7(a) + P8(a)

PCR продукт

Четвертая четверть:

(484 п.о.) GGTGAA _____ ATCAGGAGCTCATCGATCAT

третья четверть:

(484 п.о.) TTCCCCCTGTA _____ TTCACCGG

вторая половина: GGTGAA _____ CATGATCAT (953 п.о.)

Четыре позитивных клона идентифицируют за счет минискринирования плазмиды, и затем секвенируют, используя стандартные процедуры.

Плазмида Bt.P2 #1 содержит приблизительно правильную последовательность четырех четвертей, за исключением двух мутаций. Эти мутации находятся в положении 1523 (замена G на A, что приводит к изменению аминокислот: замена Arg на His) и в положении 1634 (замена C на T, что для аминокислот означает замену Thr на Ser).

Плазмиду Bt.P2 #1 используют для конструирования описываемой далее pCIB4414. (Эти ошибки окончательно исправлены за счет гибридизации всех олигомеров четвертой четверти обработкой Apa I/Bst E II и замены этого участка в pCIB4414. Поэтому только последовательности из положений 1842-1960 остаются от Bt.P2 #1 в окончательной конструкции).

Пример 3: Сборка и репарация финального синтетического гена

Синтетический оптимизированный для кукурузы Bt cryIA(b) ген конструируют для клонирования по четвертям. Используя методику PCR, однако получают мутации, которые в большинстве случаев являются делециями, возникающими за счет мутаций сдвига рамки. Плазмиды, содержащие отдельные

четверти, поэтому секвенируют, и правильные части лигируют вместе, используя стандартные процедуры.

После получения клонов первой и второй четвертей с почти нужными последовательностями, конструируют плазмиды pEB1Q#4 и pEB1Q#5 для получения целевой последовательности синтетического Vt гена вплоть до Dra III сайта в положении 634 пары оснований (эта мутация разрушает Dra III сайт). pEB1Q конструкции получают лигированием 3,9 т.п.о. Eco RI Bam HI фрагмента из pP1-8 с 400 п.о. фрагментом из pQA1. pEB1Q#5 имеет нужную последовательность вплоть до Dra III сайта, но pEB1Q#4 имеет мутацию в положении 378 пары оснований.

Плазмиды p1H1M4 и p1H1M5 конструируют для репарации Dra III сайта в pEB1Q#4 и pEB1Q#5. Плазмиды p1H1M#4 и #5 получают, лигируя 3,5 т.п.о. NcoI/Aat II фрагмент из pEB1Q#4 и #5 соответственно с 500 п.о. Nco I/Aat II фрагментом из pQB5. Плазмида p1H1M5 содержит мутацию между Sac II сайтами в положении 884 во второй четверти синтетического Vt гена. Плазмида p1H1M4 содержит дополнительную мутацию, как указано в конструкции предшественника pEB1Q#4.

Sac II сайт в Bluescript векторном участке p1H1M4 подвергают делеции, в результате обработки p1H1M4 рестриктазами Not I и Sac I, и превращения этих сайтов в тупые концы с использованием Т4 ДНК полимеразы в стандартных условиях перед лигированием этого 3,9 т.п.о. фрагмента для получения p1H1M4^{ΔS}. Проведение делеции Sac II сайта в векторном участке позволяет удалить 90 п.о. Sac II фрагмент с мутацией в положении 884 п.о. второй четверти p1H1M4 до замены Sac II фрагментом размером 90 п.о.. Олигомеры U/L 12 и 13 обрабатывают киназой и гибридизуют (как указано ранее) перед обработкой Sac II и выделением фрагмента размером 90 п.о. на 2% Nusieve геле. В вектор p1H1M4^{ΔS}, обработанный Sac II, размером около 3,8 т.п.о., который был фосфатизирован CIP, встраивают фрагмент Sac II. Репарированную Sac II конструкцию обозначают pHYB2#6. Ориентацию Sac II фрагмента в pHYB2#6 определяют PCR скринированием, как было указано ранее, используя следующие праймеры:

МК23А28 =5' -GGGGCTCGGATGCTGCCCT-3'

МК25А28 =5' -GAGCTGACCCTGACCGTCT-3'

МК26А28 =5' -CACCTGATGGACATCCTGAA-3'

Проводя PCR реакции с 50 пикомолями праймеров МК23А28 и МК25А28 получают фрагмент из приблизительно 180 п.о., что указывает на то, что вставленный фрагмент встроен в сайты в рНУВ2#6 в правильной ориентации. Используя праймеры МК25А28 и МК26А28 в актах PCR скринирования в качестве негативного контроля, получают приблизительно 180 п.о. фрагмент только в конструкции, содержащей встроенный в Sac II фрагмент в неправильной ориентации. рНУВ2#6 последовательность определяют, используя стандартные процедуры.

рНУВ2#6 имеет одну мутацию в положении 378, которую необходимо репарировать для получения первой четверти, содержащей целевую последовательность.

Плазмида р1НГ#6 содержит нужную последовательность для полной первой половины синтетического Vt гена. р1НГ#6 получают из Aat II/Nco I фрагмента р1Н1М5#2 размером 3,4 т.п.о., лигированного Aat II/Nco I фрагментом из рНУВ2#6 размером 500 п.о.

Для идентификации клонов или частичных клонов синтетического гена, которые содержат открытые рамки считывания, используют вектор селекции канамицина (описанный ранее). Четвертая четверть синтетического Vt гена является первой, помещенной в канамициновую кассету. рКМ74-4 содержит приблизительно Ara I/Cla I фрагмент из плазмиды VtP2 размером 500 п.о. (которой был ранее трансформирован дат- E.coli штамм (РО-100) для того, чтобы могла разрезаться Cla I), лигируют в рUC:KM74, обработанную Ara I/Cla I. Плазмида рКМ74-4 демонстрирует устойчивость к канамицину, но позднее было обнаружено, что она содержит две мутации замещения в положениях 1523 и 1634 (мутации описаны ранее в разделе клонирования четвертой четверти; они являются замещениями, а не делециями или вставками).

Правильную первую половину синтетического Vt гена плазмиды р1УН#6 включают в плазмиду рКМ74-4. Полученную плазмиду обозначают рКм124,

получают Ара I/Vam HI фрагмента рКМ74-4 размером около 3,9 т.п.о., лигированного с 1 т.п.о. Ара I/Vam HI фрагментом р1HG#6. рКм124 демонстрирует устойчивость к канамицину. Эта плазмида содержит первую, вторую и четвертую четверти синтетического гена, образуя единую рамку считывания.

Третья четверть синтетического гена является следующей, которую клонируют в рКМ124. Первый функциональный клон, в плазмиде рVt:Kм#6, является функциональной копией усеченного синтетического *сгуIA(b)* гена в Км-кассете, которая демонстрирует устойчивость к канамицину, но которая содержит мутации делеции между третьей и четвертой четвертями. Плазмиду рVt:Kм#6 получают из Ара I/Nco I фрагмента рКМ124 вектора, размером приблизительно 5 т.п.о., лигированного с Ара I/Nco I фрагментом размером приблизительно 500 п.о. рQCN103 (рQCN103 содержит незначительную мутацию в положении 1326, которую репарируют позднее). Кондаминирующая нуклеазная активность, по-видимому, осуществляет делецию Ара I сайта между третьей и четвертой четвертями в рVt:Kм#6. Vt ген, кодируемый синтетическим геном в плазмиде рVt:Kм#6, содержит около 50-60% нативной активности протеинов по сравнению с ECB. Sma I/Vam HI фрагмента рVt:Kм#6 размером 2 п.о. включают в 35S:экспрессионную кассету для получения плазмиды, обозначаемой 35S:Vt6.

Вначале получают два функциональных синтетических клон, каждый с мутациями: плазмиды рVt:Kм#6 и рCIB4414. рCIB4414, который на 100% активен в биоанализе насекомых против кукурузного мотылька, по сравнению с нативным геном, содержит мутации замещения в третьей и четвертой четвертях в положениях 1323, 1523 и 1634.

рCIB4414 конструируют из двух плазмид MG3.G4#18 и 1HG, которые описаны ранее. MG3.G4#18 получают за счет клонирования Ара I/Kpn I фрагмента в Vt.P2#1 плазмиды рQCN103 (используя те же самые рестрикционные сайты). В результате получают плазмиду, содержащую третью и четвертую четверти гена. Первую половину синтетического гена из плазмиды 1HG вырезают с помощью Vam HI и Nco I и перемещают в MG3.G4#18 (содержащую третью и четвертую четверти гена). Полученная плазмида,

pCIB4414, содержит функциональную версию синтетического гена. Хотя и являясь функциональным, синтетический ген в этой плазмиде содержит три ошибки: положение 1326 (G заменено на C), положение 1523 (замена G на A) и в положении 1634 (C заменено на T).

Четвертую четверть в pCIB4414 заменяют четвертой четверти Ara I/Bst E II фрагмента размером 354 п.о., полученного при гибридизации, лигировании и рестрикционной обработки олигомеров четвертой четверти, как было указано ранее, и выделении фрагмента из 2% Nusieve агарозного геля pCIB4408 является клоном синтетического Vt гена, полученным при замене фрагмента четвертой четверти в pCIB4414 гибридизованным фрагментом четвертой четверти. Для вставки CaMV 35S промотора в начало синтетического Vt гена, pCIB4406 получают из Eco NI/Kpn I фрагмента плазмиды p35SBt6 размером 4 т.п.о. и Eco NI/Kpn I фрагмента pCIB4408 размером 1,8 т.п.о..

pCIB4406 на 100% активен (по сравнению с протеином из нативного гена) против ЕСВ, но содержит мутации замещения в третьей четверти синтетического гена в положении 1323 в результате замены аминокислоты фенилаланина на лейцин. Плазмиду pBS123#13 используют для репарации этой мутации.

Фрагмент третьей четверти в плазмиде pBS123#13 получают из гибридизованного олигомерного фрагмента размером приблизительно 479 п.о. Олигомеры третьей четверти U15-U20 и L15-L21 обрабатывают киназой, гибридизуют и лигируют, как указано ранее. PCR реакции проводят, как описано ранее, с праймерами P5(a) и P6(b) для 15 циклов. PCR продукт обрабатывают протеинкиназой K в окончательной концентрации около 50 мкг/мл приблизительно в 95 мкл объема в течение 30 минут при 37°C, а затем 10 минут при 65°C (Crowe et al., Nucleic Acid Reserach 19: 184, 1991). Соответственно, продукт экстрагируют фенол/хлороформом и осаждают этанолом, используя стандартные методики перед нарезанием рестрикционными энзимами Ara I и Nco I.

Ara I/Nco I PCR фрагмент размером приблизительно 450 п.о. лигируют с Ara I/Nco I векторным фрагментом из pIHG#6 размером 3,8 т.п.о. до получения pBS123#13. Плазмида pBS123#13 содержит целевую последовательность для третьей четверти оптимизированного для кукурузы cryIA(b) гена из

положения 1319 по Nsp I сайту через Apa I сайт в положении 1493. Этот 170 bp Nsp I/Apa I фрагмент из pBS123#13 используют для полностью активного синтетического cryIA(b) гена в плазмиду pCIB4418.

Вестерн-блот анализ:

Вестерн-блот анализ различных трансформантов осуществляют, используя неочищенные экстракты, полученные из E.coli, выращиваемых на селективных пластинах. С помощью зубочистки культуры соскребают со свежих пластин, содержащих представляющие интерес трансформанты, которые выращивались в течение ночи при 37°С. Позитивный контроль для экспрессии Bt гена в E.coli представляет собой конструкцию, называемую pCIB3069, которая содержит нативный Bt-k ген, слитый с экспрессируемым в растении CaMV 35S промотором. pCIB3069 содержит также 35S промотор, операбельно связанный с геном устойчивости к гиромоцину, 35S промотор, с Adh интроном #1, операбельно связанным с GUS геном, и 35S промотор, операбельно связанный с геном, кодирующим продуцирование нативного Bt cryIA(b) IP. Негативный контроль E.coli, который не содержит Bt гена, также включен в анализ. Культуры повторно суспендируют в 100 мкл буфера, содержащего 62 mM трис-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 0,0025% бромфенолового синего, 10% глицерина и 7,5% меркаптоэтанол. После нагревания смеси при 95°С в течение 10 минут препарат обрабатывают ультразвуком в течение 1-3 секунд. Осколки центрифугируют в микроцентрифуге при комнатной температуре около 5 минут, и 10-15 мкл каждого образца помещают на акриламидный гель с 10% текучего геля снизу и 6% липкого геля (Laemmli, Nature 227: 680-685 (1970)). После проведения в течение ночи электрофореза при 10 мА, протеины переносят из геля на мембрану Immobilon (Millipore). Перенос осуществляют, используя электрофоретическую установку блоттинга (American BioNuclear, Emeryville, CA) в буфере переноса (20 mM трис, 150 mM глицина и 20% метанола) в течение 1,5 часов при 450 мА.

Буферы для вестерн-блоттинга включают:

Блокирующий буфер: 2% Tween-20
30 mM трис-HCl, pH 10,2
150 mM NaCl

Промывочный буфер: 0,05% Tween-20
 30 mM трис-HCl pH 10,2
 150 mM NaCl
 Проявляющий буфер: 100 mM трис-HCl, pH 9,6
 100 mM NaCl
 10 mM MgCl₂

После завершения переноса, мембрану инкубируют в течение 10 минут в блокирующем буфере. Проводят три 15-минутные промывки промывочным буфером перед тем, как проводят обработку первого антитела. Первое антитело представляет собой очищенное иммуноаффинное антитело кролика или козы, полученное с использованием CryIA(b) протеина в качестве антигена (Ciba-Geigy, RTP, N.C.; Rockland Inc., Gilbertsville, PA; и Berkeley Antibody CO., Richmond, CA). CryIA(b) специфические антитела обрабатывают непосредственно перед использованием с *E.coli* лизатом от Bio-Rad в 1 мл объема с 5 мкг антител, 50 мкл *E.coli* лизата в промывочном буферном растворе. Эту смесь инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре перед разбавлением его 1-30 до окончательного разбавления 1:6000 промывочным буфером. Инкубирование мембраны с первым антителом ведут при комнатной температуре в течение 1,5 часов.

Между обработками 1 и 2 антитела проводят три 10-минутные промывки. Второе антитело представляет собой либо кроличий, анти-козлий, либо козлий анти-кроличий/щелочной фосфатазный конъюгат (Sigma, St.Louis, MO). Инкубирование с конъюгатом щелочной фосфатазы проводят при комнатной температуре в течение часа, используя 1-6000 разбавление в промывочном буфере. Между обработкой второго антитела и проявлением вестерн-блота проводят шесть 10-минутных промывок. Вестерн-блот проявляют в 100 мл проявляющего буфера с 440 мкл нитросинеготетразолия в 70% диметилформамиде (75 мг/мл), и 330 мкл 5-бром-4-хлориндолилфосфата в 100% диметилформамиде (50 мг/мл). После проявления в течение 15-30 минут мембрану промывают в воде и сушат на воздухе.

Пример 4: Конструирование векторов трансформации

Конструирование pCIB710 и ее производных.

CaMV 35S промоторные кассетные плазмиды pCIB709 и pCIB710 конструируют по способу Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987). pCIB710 содержит CaMV промотор и последовательности окончания транскрипции для 35S РНК транскрипта [Covey et al., Nucl. Acids. Res., 9: 6735-6747 (1981)]. 1149 bp Bgl II рестрикционный фрагмент CaMV ДНК [bp 6494-7643 в Hohn et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 96:194-220 и Appendices A-G (1982)] выделяют из CaMV ДНК за счет препаративного электрофореза на агарозном геле, как было указано ранее. Фрагмент смешивают с BamHI-расщепленной плазмидной pUC19 ДНК, обработанной Т4 ДНК лигазой, и трансформированной в *E.coli*. (При этом BamHI рестрикционный сайт в полученной плазмиде разрушен за счет лигирования BglII липких концов с BamHI липкими концами).

Полученную плазмиду, обозначенную как pUC19/35S, используют затем в олигонуклеотид-направленном мутагенезе *in vitro* до включения BamHI распознаваемой последовательности GGATCC сразу после CaMV нуклеотида 7483 в ссылке Hohn. Полученная плазида, pCIB710, содержит CaMV 35S промоторный участок и участок окончания транскрипции, разделенные BamHI рестрикционным сайтом. ДНК последовательности, включенные в этот BamHI сайт, будут экспрессироваться в растениях с помощью тех же самых CaMV последовательностей, управляющих транскрипцией. (Заметьте также, что pCIB710 не содержит никаких ATG кодонов инициирования трансляции между началом трансляции и BamHI сайтом).

pCIB710 модифицируют для получения pCIB709 за счет включения BamHI фрагмента, содержащего кодирующую последовательность для гигромицинофосфотрансферазы из pLG90 [Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987)] в BamHI сайт.

pCIB709 модифицируют для получения pCIB996 за счет удаления ATG сразу в обратном направлении от кодона инициирования гена гигромицинофосфотрансферазы, используя стандартные методики мутагенеза, включая при этом Bgl II рестрикционный сайт в это место. Полученную плазмиду pCIB996 далее модифицируют для удаления BamHI, Sma I и Bgl II сайтов в 5' нетранслируемом лидерном участке, расположенном в 5' от кодона инициирования для кодона

инициирования. В результате изменяется ДНК основная последовательность с -TATAAGGATC CCGGGGGCA AGATCTGAGA TATG-Нуг на -TATAAGGATC TGAGATATG-Нуг. Полученная плазмида известна как pCIB3073.

В другом варианте, pCIB710 модифицируют до получения pCIB900, за счет вставки Bam HI-Bcl I фрагмента pCIB10/35SBt, которая содержит 645 аминокислотную Bt кодирующую последовательность, описанную, в частности, в С4 далее, в Bam HI сайт pCIB710 для создания pCIB710/35SBt. Для введения маркера устойчивости к антибиотику, pCIB709 обрабатывают Sal I, Kpn I/Sal I адаптер лигируют, и полученный продукт лигирования обрабатывают Kpn I. Kpn фрагмент pCIB709, содержащий 35S/ген устойчивости к гигромицину встраивают в Kpn I сайт pCIB710/35SBt для получения pCIB900.

Гены, подходящие в качестве селективируемых маркерных генов, включают ген устойчивости к гигромицину, описанный Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987). Ген гигромицина, описанный в этой ссылке, помещают в pUC плазмиду, например, pCIB710 или pCIB709, и "дополнительный" ATG в обратном направлении от последовательности, кодирующей гигромицинофосфотрансферазу, удаляют для получения pCIB996. Этот модифицированный pCIB996 ген далее модифицируют для удаления BglII, BamHI и SmaI сайтов из 5' участка гена, используя стандартные методики молекулярной биологии до получения pCIB3073.

pCIB932 является плазмидой на основе pUC19, содержащей химерный ген Рер-С:промотор/Bt/Рер-С:терминатор. Он состоит из фрагментов, полученных из pPEP-10, HindIII субклона геномного клона, H1-лямбда-14, PNAS USA, 83: 2884-2888 (1986), гена кукурузы, кодирующего РЕР карбоксилазный фермент активный в фотосинтезе, и из pCIB930, что представляет собой BamHI фрагмент, содержащий усеченную форму csgIAb эндотоксинового гена из 645 аминокислот в BamHI сайте pUC18.

EcoRI-XhoI фрагмент pPEP-10 размером 2,6 т.п.о., содержащий дополнительный сайт полиА из РЕР карбоксилазного гена, выделяют и обрабатывают PstI/HincII. Рестрикционный перевар лигируют с PstI/HincII фрагментом pUC18, трансформируют E.coli и полученные трансформанты скринируют на предмет выделения тех, которые содержат PstI-HincII вставку

размером 412 п.о. в pUC18 и эту вставку подтверждают секвенированием. Полученную плазмиду обозначают pCIB931.

Ядерный ген, кодирующий изозим фосфоенолпируваткарбоксилазы ("Per-C") описан у Hudspeth et al., Plant Molecular Biology, 12: 579-589 (1989). pCIB932 конструируют лигированием трех фрагментов. Первый фрагмент, содержащий PER-C терминатор транскрипции, получают за счет обработки pCIB931 до завершения HindIII, частично с помощью SphI, и выделяют фрагмент размером 3098 п.о.. Второй фрагмент, содержащий последовательность кодирующую эндотоксин Bt, получают, обрабатывая pCIB930 с помощью NcoI и SphI и выделяя фрагмент размером 1950 п.о.. Третий фрагмент, содержащий PER-C промотор, получают за счет обработки pPER-10 до завершения HindIII, частично с помощью NcoI, и выделяя фрагмент размером 2,3 т.п.о.. Смесью лигирования трансформируют *E.coli*, трансформанты с правильными вставками идентифицируют, и вставки подтверждают секвенированием.

pCIB932 вырезают с помощью PvuII для создания фрагмента размером 4,9 т.п.о., содержащего кукурузный Per-C:промотор/Bt/Per-C:терминатор и очищают на 1% LGT агарозном геле в 1X TAE. Линеаризированный pCIB3079 вектор и вставку размером 4,9 т.п.о. pCIB932 встраивают, используя T4 ДНК лигазу в LGT для получения pCIB4401. pCIB4401 представляет собой вектор трансформации кукурузы, содержащий химерные гены: 35S:промотор/PAT/35S:терминатор, Per-C:промотор/Bt/Per-C:терминатор и 35S:промотор/Adh1 #1 интрон/GUS/35S:терминатор.

Конструирование pCIB246 (35S-GUS-35S)

CaMV 35S промоторную кассету, pCIB246, конструируют следующим образом.

DdeI рестрикционный сайт в положении нуклеотидов 7482 CaMV генома [Franck et al., Cell, 21: 285-294 (1980)] модифицируют за счет вставки 48 п.о. олигонуклеотида, содержащего несколько сайтов рестриктаз, включая NcoI (CCATGG) сайт. SalI (GTCGAC) сайт и SstI (GAGCTC) сайт. Этот измененный CaMV 35S промотор встраивают в вектор pUC19, который был модифицирован для разрушения векторных сайтов SstI и SalI. Так, CaMV 35S промотор pCIB1500 содержит уникальные сайты SstI и SalI для клонирования.

pCIB1500 обрабатывают с помощью SstI/NcoI и лигируют с GUS геном до получения из pBI221 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). NcoI сайт сливают с GUS геном так, чтобы ATG NcoI сайта функционировал как стартовый кодон для трансляции GUS гена. CaMV 35S полиаденилирования и сигналы терминации используют для 3' конца химерного гена.

Конструирование pCIB3069 (35S-Adh1-GUS-35S)

pCIB246 модифицируют, добавляя интрон кукурузного гена алкоголь дегидрогеназы Adh1 номер 1 (Adh1) (Dennis et al., Nucleic Acids Research, 12: 3983-4000 (1984) в Sal I сайт pCIB246 для получения плазмиды pCIB3007. Adh1 интрон вырезают из кукурузного Adh1 гена как Bal I/Pst I фрагмент, и субклонируют в pUC18, которая была обработана с помощью Sma I/Pst I до получения плазмиды под названием Adh 1026. Adh 1026 обрабатывают с помощью Pvu II/Sac II, у фрагментов создают тупые концы с помощью Т4 ДНК полимеразы, добавляют Sal I линкеры, используя стандартные процедуры, и фрагмент размером около 560 п.о. выделяют из 3% NuSeive геля, и лигируют в обработанную Sal I и фосфатазой pUC18. Связанный с помощью Sal I Ash интрон #1 в полученной плазмиде обрабатывают Sal I, очищают на геле, и лигируют в Sal I обработанную Sal I и фосфатазой pCIB246 до получения плазмиды pCIB3007.

pCIB3007 обрабатывают PstI и концы затуляют, используя Т4 ДНК полимеразу (New England Biolabs) в соответствии с инструкциями. Полученные молекулы с тупыми концами разрезают Sph I, и фрагмент с одним тупым концом размером приблизительно 5,8 т.п.о. и одним SphI концом очищают на агарозном геле с низкой температурой желеобразования [LGT], используя стандартные процедуры. pCIB900 обрабатывают SmaI/SphI, и фрагмент, содержащий 35S\Bt ген очищают на LGT агарозном геле. Два очищенных на геле фрагмента лигируют в LGT агарозе, используя Т4 ДНК лигазу в соответствии со стандартными условиями. Полученными лигированными фрагментами трансформируют *E.coli*, используя стандартные процедуры и полученную плазмиду обозначают pCIB3062. Имеется две версии pCIB3062. pCIB3062#1 имеет регенерированный сайт SmaI, где SmaI сайт и Т4 полимеразный тупой конец лигируют. Наиболее вероятно это происходит за счет

Т4 полимеразного расщепления нескольких пар оснований из PstI сайта во время реакции затупления концов. pCIB3062#3 не должен содержать этого SmaI сайта.

pCIB3062#3 обрабатывают с помощью KpnI, и затупляют концы, используя Т4 ДНК полимеразу, и последовательно обрабатывают с помощью PvuII до получения 6,4 т.п.о. фрагмента с тупыми концами, содержащего 35S/GUS и 35S/Bt гены. Этот фрагмент с тупыми концами лигируют в обработанную SmaI pCIB3073 до получения pCIB3063 или pCIB3069. pCIB3069 содержит тот же фрагмент, который используют для получения pCIB3063, но все химерные гены в pCIB3069 находятся в одной относительной ориентации, в отличие от pCIB3063. Эти плазмиды содержат а) 35S промотор, операбельно связанный с геном устойчивости к гигромицину; б) 35S промотор с Adh интроном #1, операбельно связанный с GUS геном; и с) 35S промотор, операбельно связанный с геном, кодирующим получение синтетического cryIA(b) инсектицидного протеина из *Bacillus thuringiensis*, как было указано ранее.

GUS анализ:

GUS анализ проводят практически, как указано у Jefferson, Plant Mol. Bio. Reporter, 5: 387-405 (1987). Как было показано ранее, плазида pCIB246 содержит CaMV 35S промотор, слитый с GUS геном. 5' нетранслируемый лидер этого химерного гена содержит копию кукурузного Adh1 интрона #1. Его используют в качестве контроля трансформации. Хотя к каждому из трансформантов добавляют одинаковое количество pCIB246, вычисленные активности меняются среди тестируемых конструкций Bt. Величины, приводимые далее, являются средними из 3 реплицирований. pCIB4407 тестировали дважды.

pCIB3069	28 нМ MU/ед/мин
pCIB4407	0,7 нМ MU/ед/мин, 2,3 нМ MU/ед/мин

Пример 5А: Анализ синтетического cryIA(b) гена на инсектицидную активность против мотылька кукурузного

Синтетический cryIA(b) ген в pCIB4414 в *E.coli* анализируют на инсектицидную активность против мотылька кукурузного следующим образом.

Расплавленный искусственный корм насекомых выливают в 60 мм чашки Петри Gellman. После отверждения *E.coli* клетки, суспендированные в 0,1% Triton X-100, помещают на поверхность при концентрации 3×10^7 клеток/см². Пластины сушат на воздухе. 10 мотыльков кукурузных на первой стадии, *Ostrinia nubilalis*, менее 12 часов возраста помещают затем на поверхность корма. Этот тест инкубируют при 30°С в полной темноте в течение 2-5 дней. В конце этого теста записывают процент смертности. Положительный клон определяют как клон, дающий 50% или выше гибели, тогда как контрольные *E.coli* клетки дают 0-10% фоновой гибели. Для сравнения, нативный *cryIA(b)* ген в pCIB3069 тестируют в той же самой концентрации. Клоны тестируют при 3×10^7 клеток/см² корма; по 20 насекомых для клона.

Полученные результаты представлены ниже

Клон	Процент гибели
Контроль	0
pCIB3069	100
pCIB4414	100

Эти результаты показывают, что инсектицидный кристаллический протеин, продуцируемый синтетическим *cryIA(b)* геном, демонстрирует активность против мотылька кукурузного, сравнимую с той, что продуцируется IP, продуцируемым нативным *cryIA(b)*. Другие плазмиды, содержащие синтетический *cryIA(b)* ген, были проанализированы таким же способом.

Пример 5AB: Анализ *cryIA(b)* протеина на инсектицидную активность против огневки сахарного тростника

CryIA(b) экспрессируют в *E.coli*, и анализируют на инсектицидную активность против огневки сахарного тростника (*Diatrea saccharalis*) в соответствии с тем же протоколом, который использовали для мотылька кукурузного, как было описано ранее. Полученные результаты представлены ниже.

Анализ огневки Bt протеином из *E.coli*

Концентрация протеина (нг/г)	Процент гибели CryIA(b)
10	0
25	0
50	7
100	13
250	40
500	53
1000	80
LC50	380
95% CI	249-646

Полученные результаты указывают, что инсектицидный протеин, продуцируемый оптимизированным для кукурузы Vt геном, эффективен против огневки сахарного тростника. Верхние концентрации CryIA(b) протеина, 250 нг/г-1000 нг/г, могут быть достигнуты в трансгенных растениях кукурузы, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 6: Выделение кукурузного протопласта и трансформация синтетическим Vt геном

Экспрессию синтетического Vt гена анализируют в трансформированных протопластах кукурузы.

Процедура выделения протопластов:

1. Содержание 10-дневных кукурузных (2717 линии 6) суспензионных культур помещают пипеткой в 50-мл стерильные ампулы и оставляют отстаиваться. Все культуральные среды затем удаляют и сливают.

2. Клетки (3-5 мл объема клеток) снова суспендируют в 30 мл раствора протопластов энзима. Состав следующий:

3% целлюлозы RS

1% Macerozyme R10 в КМС буфере

КМС буфер (рецепт для 1 литра)

KCl 8,65 г

MgCl₂-6H₂O 16,47 г

CaCl₂-2H₂O 12,50 г

MES 5,0 г

pH 5,6, стерилизация на фильтре

3. Смесь клеточных стенок и аликвот в 100×25 мм чашках петри, около 15 мл на пластину. Встряхивают на роторном шейкере в течение 4 часов для переваривания.

4. Пипеткой пропускают 10 мл КМС через каждое из 100 мк сит, которые используют. Фильтруют содержимое чашек через сита. Промывают сита равным объемом КМС.

5. Пипеткой выдавливают осторожно протопласты в 50-мл ампулы и вращают в центрифуге Beckman TJ-6 в течение 10 минут при скорости 1000 об/мин (500 x g).

6. Удаление надосадочной жидкости и повторное суспендирование осадка осторожно в 10 мл КМС. Объединяют содержимое трех ампул с одну и доводят объем до 50 мл КМС.

7. Вращение и промывка снова за счет повторения вышеуказанной стадии.

8. Повторное суспендирование всех промытых протопластов в 50 мл КМС.

Проводят счет в гемцитометре. Вращают протопласты и повторно суспендируют при 8×10⁶/мл в ресуспендированном буфере (RS буфер). RS буфер (рецепт для 500 мл) ·

маннитол 27,33 г

CaCl₂ (0,1 М порция) 75 мл

MES 0,5 г

pH 5,8, стерилизуют на фильтре

Процедура трансформации протопластов на фильтре: 1. Аликвоты по 50 мкг плазмидной ДНК [Bt IP конструкции, как синтетические (pCIB4407), так и нативные (pCIB3069)] помещают в 15-мл полистирольные культуральные ампулы. Также аликвоты по 25 мкг GUS-содержащие плазмидные ДНК (которые не содержат Bt IP (pCIB246) помещают во все ампулы. Используют 3 репликации на конструкцию, подлежащую тестированию, с 1 репликацией, не содержащей ДНК, в качестве контроля.

Bt конструкции	GUS конструкции
----------------	-----------------

pCIB3069	pCIB246
pCIB4407	

2. Осторожно смешивают протопласты и отбирают аликвоты по 0,5 мл на ампулу.

3. Добавляют 0,5 мл PEG-40 в каждую ампулу.

Состав PEG-40:

0,4 М маннитол

0,1 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

pH 8,0, стерилизация на фильтре.

4. Осторожно перемешивают для объединения протопластов с PEG. Ждут 30 минут.

5. Последовательно добавляют 1 мл, 2 мл и 5 мл W5 раствора с 5-минутными интервалами.

W5 раствор:

154 mM NaCl

125 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5 mM KCl

5 mM глюкозы

pH 7,0, стерилизация на фильтре.

6. Вращают в течение 10 минут в центрифуге Beckman TJ-6 со скоростью около 1000 об/мин (500 g). Удаляют надосадочную жидкость.

7. Осторожно суспендируют повторно осадок в 1,5 мл FW среды и культивируют осторожно в чашках петри 35×10 мм.

Рецепт FW среды (для 1 литра):

MS соли 4,3 г

200X B5 вит. 5 мл

сахароза 30 г

пролин 1,5 г

маннитол 54 г

2,4-D 3 мг

pH 5,7, стерилизация на фильтре.

8. Инкубируют в течение ночи в темноте при комнатной температуре.

9. Проводят GUS анализ, биоанализ насекомых и ELISA на экстрактах протопластов, как описано далее.

Пример 7: Конструирование полной длины синтетического оптимизированного для кукурузы cryIA(b) гена

Последовательность 4 представляет собой последовательность, оптимизированную для кукурузы, кодирующую полной длины cryIA(b) инсектицидный протеин из *B. thuringiensis*. Описанная ранее усеченная версия представляет первые приблизительно 2 т.п.о. этого гена. Остальную часть от полной длины гена клонируют, используя описанные процедуры. Эта процедура охватывает синтез ДНК олигомеров длиной от 40 до 90 НТ, обычно используя 80-меры в качестве среднего размера. Олигомеры очищают, используя стандартные процедуры высокоэффективной хроматографии или выделение из полиакриламидного геля. Очищенные олигомеры обрабатывают киназой и гибридизуют до получения фрагментов около 500 п.о. Гибридизованные олигомеры можно амплифицировать, используя PCR в стандартных условиях. Фрагменты 500 п.о. либо непосредственно из гибридизации, из PCR амплификации, или выделенные из агарозных гелей после либо гибридизации, либо PCR амплификации, клонируют в плазмиду и трансформируют в *E.coli*, используя стандартные процедуры.

Идентифицируют рекомбинантные плазмиды, содержащие целевые вставки, как указано ранее, используя PCR и/или стандартные процедуры минискринирования. Вставки, которые оказываются правильными на основании данных о профилях их PCR и/или рестрикционных энзимов, затем секвенируют для идентификации тех клонов, которые содержат целевую открытую рамку считывания. Затем фрагменты лигируют вместе с примерно 2 т.п.о. синтетической последовательностью, описанной в примере 2, до получения полной длины оптимизированного для кукурузы синтетического cryIA(b) гена, который пригоден для экспрессии с высокими уровнями CryIA(b) протеина в кукурузе.

G + C содержание нативных и синтетических Bt генов:

полной длины нативный	38,8%
-----------------------	-------

усеченный нативный	37,2%
полной длины синтетический	64,8%
усеченный синтетический	64,6%

% гомологии финальной усеченной версии Vt гена по сравнению с "чистым" кукурузным используемым геном: 99,25%.

Пример 8: Конструирование экспрессируемого в растениях, полной длины, гибридного, частично оптимизированного для кукурузы *sguIA(b)* гена

pCIB4434 содержит полной длины *sguIA(b)* ген, состоящий из около 2 т.п.о. синтетического оптимизированного для кукурузы *sguIA(b)* гена, с остальной частью (СООН терминальная кодирующая часть) гена, полученного из нативного гена. Так, кодирующий участок представляет собой химеру между синтетическим геном и нативным геном, но получаемый при этом протеин идентичен нативному *sguIA(b)* протеину. Синтетический участок получен из нуклеотидов 1-1938 (аминокислоты 1-646) и нативной кодирующей последовательности из нуклеотидов 1939-3468 (аминокислоты 647-1155). Последовательность этого гена представлена на фиг.7. Карта pCIB4434 представлена на фиг.8.

Нижеследующие олигомеры сконструированы для получения pCIB4434:

KE134A28 = 5'-CGTGACCGAC TACCACATCG ATCAAGTATC CAATTTAGTT
GAGT-3'

KE135A28 = 5'-ACTCAACTAA ATTGGATACT TGATCGATGT GGTAGTCGGTC
ACG-3'

KE136A28 = 5'-GCAGATCTGA GCTCTTAGGT ACCCAATAGC GTAACGT-3'

KE137A28 = 5'-GCTGATTATG CATCAGCCTAT-3'

KE138A28 = 5'-GCAGATCTGA GCTCTTATTC CTCCATAAGA AGTAATTC-3'

MK05A28 = 5'-CAAAGGTACC CAATAGCGTA ACG-3'

MK35A28 = 5'-AACGAGGTGT ACATCGACCG-3'

pCIB4434 конструируют, используя четырехкратное лигирование фрагмента pCIB4418 размером 5,7 т.п.о., Bst E II/Kpn I PCR-полученным синтетическим: нативным фрагментом слияния размером 346 п.о., kpnI/NsiI нативным cryIA(b) фрагмента размером 108 п.о. pCIB1315, и NsiI/BglII PCR-полученным продуктом размером 224 п.о.. Стандартные условия для лигирования и трансформации описаны ранее.

Фрагмент слияния синтетического:нативного гена получают в две стадии, используя PCR. Первый PCR фрагмент слияния размером 253 п.о. получают, используя 100 пмолей олигомеров KE134A28 и MK04A28 с приблизительно 200 нг нативного cryIA(b) мишени в 100 мкл объема, 200 нм каждого dNTФ, 1X PCR буфер (Perkin Elmer Cetus), 20% глицерина и 5 ед. Taq полимеразы (Perkin Elmer Cetus). PCR реакцию ведут следующими образом: 1 минута при 94°C, 1 минута при 55°C, 45 секунд при 72°C, с удлинением 3 в течение 3 секунд для 25 циклов. Фракцию (1%) этой первой PCR реакции используют в качестве

мишени вместе с 200 нг синтетической *сгуIA(b)* ДНК для получения полного синтетического-нативного фрагмента размером 351 п.о.. Олигомеры, используемые в качестве PCR праймеров, в этой второй PCR реакции, представляют собой 50 пмолей МК35А28, 50 пмолей МК04А28 и 25 пмолей КЕ135А28. PCR реакционная смесь и параметры такие же, что указанные ранее. Полученный синтетический-нативный фрагмент слияния размером 351 п.о. обрабатывают Протеинкиназой К в концентрации 50 ед/мл и экстрагируют смесью фенол/хлороформ с последующим осаждением этанолом перед обработкой Bst E II/Крп I, используя стандартные условия. Фрагмент Nsi I/Bgl II PCR размером 224 п.о. используют для получения рСІВ4434, используя 100 пмолей олигомеров КЕ137А28 и КЕ138А28 и 200 нг нативного *сгуIA(b)* гена в качестве матрицы в 100 мкл объема с той же самой PCR реакционной смесью и параметрами, что перечислены ранее. PCR нативный *сгуIA(b)* фрагмент размером 230 п.о. обрабатывают Протеинкиназой К, экстрагируют фенол/хлороформом и осаждают этанолом, как указано ранее, перед обработкой Nsi I/Bgl II. рСІВ4434 трансформируют кукурузные протопласты, как указано ранее. Используют линию 6 2717 протопластов с рСІВ4434 и рСІВ4419 в качестве контроля для сравнения. Полученные результаты приведены ниже.

	нг Vt/мг протеиназ
4419(35S)	14400 ± 2100
4434 (полной длины)	2200 ± 900

Фон = 13 нг Vt/мг протеина для нетрансформированных протопластов.

Полученные результаты показывают, что рСІВ4434 экспрессируется на уровне около 15% от рСІВ4419. Вестерн-блот анализ показывает, что, по крайней мере, одна треть *сгуIA(b)* протеина, продуцируемого рСІВ4434 в этой системе, имеет размеры 130 кД. Поэтому значительное количество полной длины *сгуIA(b)* протеина продуцируется в клетках кукурузы за счет экспрессии рСІВ4434.

Пример 7: Конструирование полной длины, *сгуIA(b)* генов, кодирующих температуро-стабильный *сгуIA(b)* протеин

Далее описаны конструкции pCIB5511-5515, каждая из которых содержит полной длины *cryIA(b)* ген. В этих последовательностях, 26 аминокислотные делеции между аминокислотами 793 и 794, KCGEPNRCAPII-LEWNPDLDCSCRDGE, которые присутствуют в *cryIA(a)* и *cryIA(c)*, но не в *cryIA(b)*, были репарированы. Ген в pCIB5513 является синтетическим; остальные четыре гена являются гибридами, и таким образом, частично оптимизированы для кукурузы.

Конструирование pCIB5511:

Эту плазмиду получают из pCIB4434. Карта pCIB5511 представлена на фиг.10. сегмент ДНК размером 435 п.о. между парами оснований 2165 и 2590 конструируют за счет гибридизации синтетических олигомеров, сконструированных для представления верхней и нижней нити, как указано ранее, для конструирования усеченного *cryIA(b)* гена. Это сегмент синтетической ДНК синтезируют, используя стандартные известные специалистам методики, и включают 26 аминокислотную делецию, которая, как обнаружено, существует в природе в *cryIA(b)* протеине в *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1. Полный встроенный сегмент ДНК содержит оптимизированные для кукурузы кодоны предпочтительно используемые для кодирования аминокислот. 26 аминокислот, которые используют для репарации встречающихся в природе делеций, содержатся в этом фрагменте. Их включают, начиная с положения 2387 между KpnI сайтом у nt 2170 и XbaI сайтом у nt 2508 (2586 в pCIB5511) pCIB4434. pCIB5511 конструируют за счет трех-стадийного лигирования с использованием фрагмента размером 3,2 т.п.о., полученного в результате обработки pCIB4434 с помощью SphI и KpnI, фрагмента размером 3,8 т.п.о., полученного за счет переваривания pCIB4434 с помощью SphI и XbaI, фрагмента размером 416 п.о., получаемого за счет переваривания описанной ранее синтетической ДНК с помощью KpnI и Xba. Ферментативные реакции проводят в стандартных условиях, после лигирования, ДНК смесью трансформируют компетентные *E.coli* клетки, используя стандартные процедуры. Трансформанты отбирают на L-агаре, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. Плазмиды в трансформантах изучают, используя стандартные процедуры минискринирования. Последова-

тельность репарированного *cryIA(b)* гена, кодирующего *cryIA(b)* термостабильный протеин, представлена далее на фиг.9.

Конструирование pCIB5512:

Эта плазмидная конструкция является производной pCIB4434. Карта pCIB5512 представлена на фиг.12. ДНК для репарации делеции из 26 аминокислот получают, используя стандартные методики ДНК синтеза и энзимативные реакции. Получают три двунитевые ДНК кассеты, pGFcas1, pGFcas2 и pGFcas3, каждая размером около 300 п.о. Эти кассеты сконструированы так, чтобы они содержали оптимизированные для кукурузы кодоны, при этом сохраняя 100% аминокислотную идентичность с инсектицидным протеином. Эти кассеты используют для замены участка между рестрикционным сайтом BstEII в положении 1824 и XbaI в положении 2508, и включают вставку дополнительных 78 п.о., которые кодируют утерянные 26 аминокислот (описаны ранее для pCIB5511 и pCIB4434). Каждую из этих кассет клонируют в EcoRV сайт вектора Bluescript (Stratagene) стандартными способами. Эти три кассеты сконструированы так, чтобы они содержали перекрывающиеся сайты рестрикции. Кассета 1 содержит сайты рестрикции BstEII по 5' концу и EcoRV по 3' концу: кассета 2 содержит EcoRV по 5' концу и ClaI по 3' концу, а кассета 3 содержит ClaI по 5' концу и XbaI по 3' концу. Их клонируют отдельно в Bluescript и полный фрагмент размером 762 п.о. затем собирают лигированием, используя стандартные методики. pCIB5512 собирают, используя фрагмент размером 762 п.о. и лигируя его с фрагментом размером 6,65 т.п.о., полученным за счет полной обработки pCIB4434 с помощью BstEII и частичной обработки с помощью XbaI. В другом варианте можно использовать четырех-стадийное лигирование с тем же самым вектором и тремя кассетами, обработанными специфическими энзимами. Энзиматические реакции проводят в стандартных условиях. После лигирования ДНК смесью трансформируют компетентные *E.coli* клетки, используя стандартные процедуры. Трансформанты отбирают на L-агаре, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. Плазмиды в трансформантах изучают, используя стандартные процедуры минискринирования. Полученная плаزمида является pCIB5512. Последовательность репарированного *cryIA(b)* гена представлена на фиг.11. Эта репарированная *cryIA(b)*

отличается от тех, которые содержат pCIB5511, тем, что больший участок cryIA(b) кодирующего участка оптимизирован для экспрессии в кукурузе за счет использования кукурузных предпочтительных кодонов.

Конструирование pCIB5513:

Эта плаزمида содержит репарированный cryIA(b) ген, полученный из pCIB5512. Карта pCIB5513 представлена на фиг.14. Участок 3' из XbaI сайта в положении 2586 до конца гена (BglII сайт в положении 3572) заменен полностью оптимизированными для кукурузы кодонами. Этот участок синтезируют, используя стандартные методики ДНК синтеза и энзимативные реакции, хорошо известные специалистам, как четыре двунитевые кассеты (кассеты №№ 4, 5, 6 и 7). Соседние кассеты имеют перекрывающиеся сайты рестрикции для облегчения сборки между кассетами. Они являются XbaI и XhoI по 5' и 3' концам кассеты 4; XhoI и SacI по 5' и 3' концам, соответственно для кассеты 5; SacI и BstXI по 5' и 3' концам, соответственно для кассеты 6; BstXI и BglII по 5' и 3' концам, соответственно для кассеты 7. Как было указано для pCIB5512, кассеты клонируют в сайт EcoRV с тупыми концами вектора Bluescript (Stratagene), и полной длины "репарированный" cryIA(b) ген клонируют либо последовательной сборкой вышеуказанных кассет в Bluescript с последующим лигированием полного синтетического участка размером 967 п.о. с фрагментом размером 6448 п.о., полученным полным перевариванием pCIB5512 с помощью BglII и частичным перевариванием с помощью XbaI. В другом варианте получают плазмиду, содержащую полной длины гены, за счет 5-стадийного лигирования каждой из четырех кассет (после расщепления соответствующими энзимами) и указанного ранее вектора. Последовательность полной длины "репарированного" cryIA(b) гена представлена на фиг.13. Протеин, кодируемый различными синтетическими и синтетическими/нативными кодирующими участками химер, кодирует тот же самый протеин. Этот протеин является термостабильной версией cryIA(b), продуцируемой за счет репарации природной 26 аминокислотной делеции, встречающейся в cryIA(b) гене от Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1, если гомологичный участок сравнивают с либо cryIA(a), либо cryIA(c) Bacillus thuringiensis дельта-эндотоксинами.

Конструирование pCIB5514:

Эта плазида получена из pCIB4434. Карта pCIB5514 представлена на фиг.16. Она получена с использованием синтетической ДНК кассеты № 3 (см. ранее), которая содержит оптимизированную для кукурузы последовательность участка между ClaI сайтом (положение 2396), найденным в 26 аминокислотном термостабильном участке, и XbaI сайтом в положении 2508 в pCIB4434 (2586 в pCIB5511). Участок между nt 2113 pCIB4434 и соединением термостабильного участка является PCR амплифицированным за счет использования pCIB4434 в качестве матрицы со следующими праймерами:

в прямом направлении:

5'-GCACCGATATCACCATCCAAGGAGGCGATGACGTATTCAAAG-3'

обратный:

5'-AGCGCATCGATTCCGGCTCCCCGC ACTTGCCGATTGGACTTGGGGC-TGAAAG-3'

Затем PCR продукт переваривают рестрикционными энзимами KpnI и ClaI, и лигируют в четырехстадийной реакции с фрагментом размером 189 п.о., полученным при переваривании кассеты 3 с помощью ClaI и XbaI, фрагментом pCIB4434 размером 3,2 т.п.о. полученным в результате обработки SphI и KpnI, и фрагмента pCIB4434 размером 3,8 т.п.о., полученным при обработке SphI и XbaI. Ферментативные реакции ведут в стандартных условиях. Продуктом лигирования трансформируют компетентные *E.coli* клетки, отобранные с ампициллином и скринированные с использованием стандартных процедур, описанных ранее. Последовательность репарированного *sgyIA(b)* гена, содержащегося в pCIB5514, представлены на фиг.15.

Конструирование pCIB5515:

pCIB4434 модифицируют, добавляя термостабильный элемент размером 78 п.о. Geiser (Geiser TSE), описанного ранее, между KpnI сайтом (2170 bp) и XbaI сайтом (2508 bp) в нативном ВТК участке. Точный сайт вставки начинается у нуклеотида № 2379. Участок, содержащий Geiser TSE, амплифицируют двумя наборами PCR реакций, то есть, KpnI-Geiser TSE фрагмент и Geiser TSE-XbaI фрагмент.

PCR праймер #1: (KpnI сайт)

5' - ATTACGTTAC GCTATTGGGT ACCTTTGATG - 3'

PCR праймер #2: (Geiser TSE нижний)

5' - TCCCCGTCCC TGCAGCTGCA GTCTAGGTCC GGGTTCCACT

CCAGGTGCGG AGCGCATCGA TTCGGCTCCC CGCACTTGCC

GATTGGACTT GGGGCTGA - 3'

PCR праймер #3: (Geiser TSE верхний)

5' - CAAGTGCGGG GAGCCGAATC GATGCGCTCC GCACCTGGAG

TGGAACCCGG ACCTAGACTG CAGCTGCAGG GACGGGGAAA

AATGTGCCCCA TCATTCCC - 3'

PCR праймер #4: (XbaI сайт)

5' - TGGTTTCTCT TCGAGAAATT CTAGATTTCC - 3'

После амплификации PCR фрагменты обрабатывают с помощью (KpnI + ClaI) и (ClaI + XbaI), соответственно. Эти два фрагмента лигируют обработанной KpnI и XbaI pCIB4434. Полученная конструкция pCIB5515 является pCIB4434 с Geiser TSE и дополнительным ClaI сайтом, фланкируемой KpnI и XbaI. Карта pCIB5515 представлена на фиг.38. Содержащийся в ней cryIA(b) ген, который кодирует температурно-стабильный cryIA(b) протеин, представлен на фиг.37.

Примеры 9-20, представленные далее, относятся к выделению и характеристизации сердцевино-предпочтительного промотора.

Пример 9: Выделение РНК и Нозерн-блоттинг

Все РНК выделяют из растений, выращиваемых в тепличных условиях. Полную РНК выделяют по способу Kramer et al., Plant Physiol., 90: 1214-1220 (1990) из следующих тканей линии кукурузы Funk 5N984: 8, 11, 15, 25, 35, 40 и 60 дневные зеленые листья; 8, 11, 15, 25, 35, 39, 46, 60 и 70 дневные сердцевин; 60 и 70 дневные стержневые корни: из кукурузной линии Funk 5N984 оболочки початков. РНК выделяют также из 14 дневных 211D корней и из развивающихся семян с недельными интервалами для недель 1-5 после опыления. Поли А+ РНК выделяют, используя олиго-dT, как описано у Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), 1989, и проводят Нозерн-блоттинг, также по Sambrook et al., используя либо полную РНК (30 мкг), либо поли А+ РНК (2-10 мкг). После электрофореза РНК подвергают блоттингу на мембранах Nitroplus 2000 (Micron Separations Inc.). РНК связывают с фильтром, используя Stratalinker (Stratagene) при 0,2 мДжоу-

лях. Нозерн-продукты зондируют EcoRI (TRpA) 8-2 кДНК фрагментом сердцевины размером 1200 п.о., выделяют, используя 0,8% агарозу с низкой температурой плавления в TBE буферной системе. Нозерн-продукты гибридизуют и промывают, а фильтры экспонируют на пленке, как описано в разделе "Выделение кДНК клонов".

Пример 10: Выделение кДНК клонов

Первый синтез кДНК нити проводят, используя систему BRL AMV обратной транскриптазы, используя условия, оговоренные поставщиком (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Отдельно 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM трис-HCl, pH 8,3, 20 mM KCl, 1 mM DTT, 6 mM MgCl₂, 2 mM каждой из dNTP, 0,1 mM олиго (dT)₁₂₋₁₈, 2 мкг поли(A+) РНК сердцевины, 100 мкг/мл BSA, 50 мкг/мл актиномина D, 8 ед. плацентал РНазы ингибитора, 1 мкл (10 mM Си/мл) 32P dCTP >3000 мКюри/мМ в качестве трейсера, и 30 ед. AMV обратной транскриптазы инкубируют при 42°С в течение 30 минут. Дополнительный KCl добавляют до концентрации 50 mM, и инкубирование продолжают еще 30 минут при 42°С. Снова добавляют KCl до получения окончательной концентрации 100 mM. Добавляют дополнительный AMV обратной транскриптазы реакционный буфер для поддержания исходной концентрации других компонентов плюс дополнительно 10 единиц, и инкубирование продолжают при 42°С еще в течение 30 минут. Синтез второй нити завершают, используя кДНК систему синтеза Riboclone с EcoRI линкерами (Promega, Madison, WI). Размеры двунитевой ДНК определяют на 1% агарозном геле, используя трис-боратный-ЕДТА буфер, как указано у Sambrook et al., и показано, что средний размер составляет около 1,2 т.п.о. кДНК фракционируют по размерам, используя NA45 DEAE мембрану, с тем, чтобы сохранить те молекулы, размер которых 1000 п.о. или более, используя условия, указанные поставщиком (Schleicher and Schuell). Фракционированные по размерам кДНК лигируют в Лямбда ZapII вектор (Stratagene, La Jolla, CA) и упаковывают в лямбда частицы, используя Gigapack II Plus (Stratagene, La Jolla, CA). Неамплифицированная библиотека имеет титр 315000 pfu, тогда как амплифицированная библиотека имеет титр 3,5 биллион/мл с использованием PLK-F' клеток.

Рекомбинантный фаг помещают с плотностью 5000 pfu на L-агарные пластины размером 150×15 мм. Полный 50000 фаг скринируют, используя двойной подъем с каждой пластины, и создают зонды первой нити кДНК, полученной либо из мРНК сердцевины, либо из полученной из мРНК семян. Подъем осуществляют по способу Sambrook et al., используя нитроцеллюлозные фильтры. ДНК фиксируют на фильтрах, сшивая УФ, используя Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA) при 0,2 мДж. Прегибридизацию и гибридизацию фильтра выполняют в растворе 10X Denhardt's раствора, 150 мкг/мл ДНК спермы лосося, 1% SDS 50 мМ фосфата натрия, pH 7,5 EDTA, 6X SSC, 0,05% пиррофосфата натрия. Предварительную гибридизацию ведут при 62°С в течение 4 часов, а гибридизацию ведут при 62°С в течение 18 часов (в течение ночи) с 1 млн срт/мл в объеме 40 мл. Фильтры промывают в 500 мл 2X SSC, 0,5% SDS при комнатной температуре в течение 15 минут, затем при 63°С в 0,1X SSC, 0,5% SDS в течение 30 минут для каждой промывки.

Радиомеченные ДНК зонды изготавливают, используя BRL статистическую систему мечения, в поправки на общие счета вносят, используя Nick Column (Pharmacia). Затем фильтры экспонируют в течение ночи на рентгеновскую пленку Kodak X-Omat AR X-ray с (DuPont) Cronex Lightning Plus интенсифицирующими экранами при -80°С. Бляшки, которые демонстрируют гибридизацию с полученными из сердцевины зондами, но не с полученными из семян зондами, очищают для дальнейшей характеристики.

Пример 11: Выделение геномных клонов

Геномную ДНК из инбредной линии кукурузы Функа 211D выделяют по способу Shure et al., Cell, 35: 225-233 (1988). ДНК частично переваривают Sau 3A и последовательно фракционируют по размерам на градиентах 10-40% сахарозы, центрифугируют в роторе Beckman SW40 при скорости 22000 об/мин в течение 20 часов при 20°С. Фракции в интервале значений 9-23 т.п.о. собирают и осаждают этанолом. Лямбда Dash II (Stratagene), обрабатывают Bam HI, используют, как описано в качестве источника. Библиотеку скринируют неамплифицированную, и всего 300000 pfu скринируют, используя описанные ранее условия. Библиотеку зондируют, используя специфический для сердцевины (TgrA) кДНК клон 8-2, pCIB5600, который идентифицирован в

другом скринировании кДНК библиотеки. Выделенные клоны очищают, и крупномасштабные препараты фага получают, используя Lambdasorb (Promega) в соответствии с указаниями поставщика. Выделенные геномные клоны обрабатывают EcoRI и EcoRI фрагмент размером 4,8 т.п.о. субклонируют в Bluescript вектор (Stratagene).

Пример 12: ДНК последовательности и компьютерный анализ

Нуклеотидное секвенирование осуществляют, используя способ дидеоксиг-терминации цепи, раскрытый у Sanger et al., PNAS, 74: 5463-5467 (1977). Секвенированные праймеры были синтезированы на ДНК синтезаторе Applied Biosystems модель 380В, используя стандартные условия. Реакции секвенирования осуществляют, используя систему Sequenase (US Biochemical Corp.). Анализ на геле осуществляют на 40 см гелях из 6% полиакриламида с 7М мочевиной в Tris-борат-ЕДТА буфере (BRL Gel-Mix 6). Анализ последовательностей и сравнение с последовательностями в банке генов проводили, используя компьютерное обеспечение U. of Wisconsin Genetic Computer Group Sequence Analysis Software (UWGCG).

Пример 13: Картирование сайта начала транскрипции

Удлинение праймера осуществляют в соответствии со способом Metraux et al., PNAS, 86: 896-900 (1988). 30 мкг полной РНК сердцевинки кукурузы отжигают с праймером в 50 мМ Tris, рН 7,5, 40 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂ (RT буфер), нагревая до 80°С в течение 10 минут и медленно охлаждая до 42°С. Смесь РНК/праймер оставляют для гибридизации в течение ночи. Добавляют дополнительный буфер RT DTT до 6 мМ, BSA до 0,1 мг/мл, РНКsin при 4 ед./мл и dNTP по 1 мМ каждый. Затем 8 единиц AMV обратной транскриптазы добавляют и реакционную смесь помещают при 37°С на 1 час. В качестве праймера используют 5'-CCGTTCGTTC CTCCTTCGTC GAGG-3', который начинается на +90 п.о. относительно старта транскрипции. См. фиг.29А. "Лестницу" секвенирования с использованием того же праймера, что и в реакции удлинения праймера, создают, используя 4,8 т.п.о. геномный клон для того, чтобы была возможность определить сайт начала транскрипции. Реакцию секвенирования ведут, как указано в примере 12.

Защиту RNазы используют для определения того, непрерывна ли 371 п.о. последовательность от +2 п.о. до +373 п.о. (начало кДНК), или она содержит один или более из интронов. Фрагмент 385 п.о. SphI-NcoI, простирающийся от -2 п.о. до +387 п.о. относительно начала транскрипции (см. фиг.29В) клонируют в pGEM-5Zf(+) (Promega) и транскрибируют, используя систему Riboprobe Gemini (Promega) из SP6 промотора для создания радиоактивного антисмыслового РНК зонда в соответствии с указаниями поставщика. Защиту РНКазы осуществляют по способу, описанному Sambrook et al. pBR322 (обрабатывают HpaII и конец метят 32P-dCTP), а фрагмент Кленова используют в качестве маркеров молекулярного веса. В качестве геля используют 6% акриламид/7М мочевины (BRL Gel-Mix 6) и проводят при постоянной мощности 60 Вт.

Пример 14: Геномный Саузерн блоттинг

Геномную ДНК выделяют из линии кукурузы 211D, используя процедуру Shure et al., 8 мкг геномной ДНК используют для обработки каждой рестриктазой. Нижеследующие ферменты используют в буфере, предложенном поставщиком: BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII и SacI. кДНК клон сердцевины номер 8-2 используют для оценки количества генных копий. Рестрикцию ДНК ведут на 0,7% агарозном геле, используя трис-борат-ЕДТА буферную систему. Гель предварительно обрабатывают 250 мМ HCl в течение 15 минут для облегчения переноса высокомолекулярной ДНК. ДНК переносят на мембрану Nitroplus 200, и затем зондируют кДНК 8-2 сердцевины. Полученный блот промывают, как указано в примере 10.

Пример 15: PCR материалы и способы

PCR реакции осуществляют, используя набор реагентов GeneAmp, для ДНК Амплификации и AmpliTaq рекомбинантную Taq ДНК полимеразу (Perkin Elmer Cetus). Условия реакции следующие: 0,1 до 0,5 едМ каждого из двух праймеров используют в реакции, 25 нг 4,8 т.п.о. EcoRI фрагмента ДНК сердцевины в Bluescript, плюс PCR реакционную смесь, описанную поставщиком, до полного объема 50 едл в 0,5 мкл в 0,5 мл GeneAmp реакционной ампуле (Perkin Elmer Cetus). ДНК термоциклер (Perkin Elmer Cetus) с использованием программы Step-Cycle устанавливают на денатурирование при 94°С в течение 60 сек,

отжиг при 55°С в течение 60 сек, и удлинение при 72°С в течение 45 сек, с последующим 3 сек на цикл удлинением до полного количества 30 циклов. Используют следующие праймеры: I. 83 X 84, - 429 п.о. до -2 п.о.; II. 49 x 73, - 69 п.о. до +91 п.о.; III. 38 X 41, +136 п.о. до +258 п.о.; и IV. 40 X 75 +239 п.о. до +372 п.о. Они отмечены на фиг.24.

Пример 16: Выделение клона, предпочтительного для сердцевины

кДНК библиотеку, полученную из мРНК сердцевины, клонируют в Лямбда Зар, и скринируют с использованием первой нити кДНК, полученной либо из мРНК сердцевины, либо из семян. Клоны, которые гибридизовались только с зондом из ДНК сердцевины, очищают и снова скринируют. Клоны, прошедшие второе скринирование, используют в качестве зондов в Нозерн блоттинга с РНК из различных тканей кукурузы.

Пример 17: Строение гена и анализ последовательности

1,2 т.п.о. вставку кДНК клона 8-2 секвенируют, используя дидеокси способ Sanger et al. Аналогично, геномный эквивалент, содержащийся на 4,8 т.п.о. EcoRI фрагменте в Bluescript, обозначенный как pCIB5601, секвенируют. Эта информация выявляет, что геномная копия кодирующего участка простирается на 1,7 т.п.о. и содержит 5 интронов. мРНК транскрипт представляет 6 экзонов. Это показано на фиг.24. Экзоны имеют размеры от 43 п.о. до 313 п.о., а интроны варьируются по размерам от 76 п.о. до 130 п.о. Полная последовательность гена и его соответствующая определенная аминокислотная последовательность представлены на фиг.24.

Этот ген кодирует протеин из 346 аминокислот с молекулярной массой около 38 кД. Как видно из таблицы 1, предсказанный протеин демонстрирует 62% аналогии и 41% идентичности с субъединичным протеином *Pseudomonas aeruginosa* и обладает высокой гомологией с TgrA протеинами из других организмов.

Таблица 1

Консервативность TgrA последовательностей среди TgrA гена кукурузы и других организмов

Сравниваемые организмы	% аминокислотной схожести	% аминокислотной идентичности
------------------------	---------------------------	-------------------------------

<u>Haloferax volcanii</u>	56,4	36,1
<u>Methanococcus voltae</u>	58,1	35,1
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	62,5	41,8
<u>Neurospora crassa</u>	61,4	39,3
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	56,7	36,1

Группировки аналогий: I=L=M=V, D=E, F=Y, K=R, N=Q, S=T.

Проверка аналогий идентичности проводилась с использованием GAP программ из UWCGG.

Crawford et al., Ann. Rev. Microbiol., 43: 567-600 (1989) (включено сюда по ссылке) обнаружили участки консервативных аминокислот в бактериальных *trpA* генах. Это аминокислоты 49-58, аминокислоты 181-184, и аминокислоты 213-216, причем остальные части гена демонстрируют гораздо большую вариабельность, нежели обнаруживается для *TrpB* последовательности. Параллельное расположение известных *trpA* протеинов с *TrpA* протеином кукурузы (не показано) иллюстрирует значительную гомологию между геном кукурузы и другими *trpA* протеинами. Кроме того, она сравнима с уровнем гомологии, который наблюдался при сравнении других *TrpA* протеинов, как описано Crawford et al.

Для определения положения сайта старта транскрипции и присутствия в этом участке интронов были использованы четыре полимеразные цепные реакции (PCR), создающие фрагменты около 122 п.о. = 427 п.о. из участка -429 п.о. до +372 п.о. для Нозерн анализов. Полученные в нозерн анализах результаты показывают, что PCR зонды II, III, IV гибридизуются с полной РНК сердцевины, а PCR зонд I не гибридизуется. Это указывает на то что старт транскрипции находится на участке -69 п.о. +90 п.о. Для более точного определения расположения сайта начала транскрипции используют праймер удлинения. На фиг.29А видно, что если праймер (#73), расположенный у +90 п.о. относительно начала транскрипции, используют в качестве праймера удлинения, сайт начала транскрипции расположен у +1, 1726 п.о. геномной последовательности.

Первый АТГ из сайта начала транскрипции находится у +114 п.о. Ожидается, что именно АТГ служит сайтом для инициирования трансляции. АТГ начинает считывание, которое переходит в открытую рамку считывания, которая найдена в кДНК клоне. Первые 60 аминокислот этой предсказанной открытой рамки считывания сильно напоминает транзитный пептид хлоропластов. См., Berlyn et al., PNAS, 86: 4604-4608 (1989) и Neumann-Karlin et al., EMBO J., 5: 9-13 (1986). Этот результат предполагает, что этот протеин переносится в пластиды и, по-видимому, процессирован для получения активного протеина. Временной анализ экспрессии в системе мезофильных протопластов кукурузы с использованием оптимизированного для кукурузы Вt гена, управляемый trpA промотором, показывает, что если АТГ, расположенный у +114 п.о., используют в качестве точки слияния, тогда достигают наиболее высоких уровней экспрессии. Использование же любых следующих АТГ в последовательности существенно снижает уровень экспрессии репортерного гена. АТГ у +390 п.о. обеспечивает некоторую активность, но на гораздо более низком уровне, нежели +114 АТГ, тогда как АТГ у +201 п.о. вовсе не обеспечивает активности.

Хотя ряд ТАТА подобных блоков расположены в прямом направлении сайта начала транскрипции у +1 п.о. ТАТААТ у -132 п.о. наиболее напоминает растительный консенсус ТАТАА. См., Joshi, Nuc. Acids Res., 15: 6643-6653 (1987). Предполагаемый ССААТ сходный блок найден у -231 п.о. Нуклеотидная последовательность, окружающая АТГ стартовый код (GCGACATGGC) имеет гомологию с другими трансляционными стартами кукурузы, что указано у Messing et al., Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, Plenum Press, pp.211-227 (1983), но отличается от консенсусной последовательности в растениях (ANNATGGC). См. Joshi, ранее. Предполагаемый поли(А) сигнал присоединения расположен у 3719 п.о. (ААТААА) геномной последовательности, 52 п.о. от конца кДНК. Эта последовательность соответствует известным последовательностям кукурузы, как указано у Dean et al., Nucl. Acids Res., 14: 2229-2240 (1986), и расположена на 346 п.о. в обратном направлении от конца трансляции протеина. См. Dean et al., Nucl. Acids Res., 14: 2229-2240 (1986). 3'

нетранслируемая последовательностью кДНК оканчивается у 3775 п.о. геномной последовательности.

На фиг.28 представлен Саузерн блоттинг геномной ДНК кукурузы 211D, с рядом приблизительных генных копий, что реконструировано с использованием генной 8-2 кДНК сердцевин. После обработки рестриктазой и реконструкции оказывается, что по-видимому, 1-2 копии гена присутствуют в гаплоидном геноме. По-видимому, нет других генов с более низкими уровнями гомологии с этим геном. Поэтому он представляет уникальный или малочисленный член семейства генов кукурузы.

Пример 18: Защита РНКазы

Структуру 5' конца мРНК определяют, используя способы защиты РНКазы. Защиту РНКазы осуществляют, используя зонд, представляющий 385 nt от +2 п.о. до +387 п.о. Этот участок из геномного клона помещают в вектор транскрипции РНК рGEM-5Zf(+) и 32Р меченый ДНК зонд, создают с использованием SP6 полимеразы. Этот зонд и дополнительные основания из сайта множественного клонирования продуцируют транскрипт из 461 nt. Этот зонд гибридизуют с полной РНК сердцевин, и затем переваривают со смесью РНКазы А и T1, а защищенные фрагменты анализируют на денатурирующих полиакриламидных гелях. Анализ гелей показывает защищенный фрагмент около 355 nt и другой фрагмент около 160 nt. См. фиг.29В.

Тот факт, что удлинение праймера с использованием праймера (#73) у +80 п.о. приводит к получению продукта 90 NT длиной, является аргументом в пользу того, что 5' конец транскрипта расположен в положении +1 п.о. Удлинение праймера из праймера в этом участке приводит к получению продукта, так что можно ожидать, что его также можно будет детектировать в анализе защиты РНКазы. Этот праймер расположен у 5' участка зонда защиты РНКазы. кДНК клон содержит последовательности, представленные в 3' конце зонда защиты РНКазы, и, следовательно, как ожидается, будет защищен в этом анализе. Так как на геле присутствует только одна полоса, которую можно рассматривать как относящуюся к обоим из этих последовательностей, мы уверены, что защищенный фрагмент действительно является большей полосой, и что меньшая полоса является артефактом. Если в этом участке имеется интрон, в

зонде должны присутствовать фрагменты с каждого конца, и, следовательно, должны быть детектируемы на геле. Из двух видимых полос, одна из них, по-видимому, представляет полный 5' участок, и поэтому нам кажется, что в этом участке нет интрона.

Пример 19: Комплементация E. coli TrpA мутанта с сердцевиной кДНК 8-2

E.coli штамм CGSC штамма 5531 из E.coli Genetic Stock Center, Yale University (O.H. Smith lab strain designation, #M5004) с хромосомными маркерами *glnA3*, *TrpA9825*, *1-,IN(rrND-rrNE)*, *thi-1* как указано Mayer et al., Mol. Gen. Gentet., 137: 131-142 (1975) трансформируют либо (TrpA) кДНК сердцевины 8-2 или Bluescript плазмидой (Stratagene), как указано у Sambrook et al., ранее. Трансформанты, содержащие TrpA кДНК 8-2, обладают способностью расти без наличия триптофана на минимальной среде, тогда как трансформанты с Bluescript (Stratagene) плазмидой или нетрансформированный контроль не способны расти без триптофана. Клетки, трансформированные кукурузным TrpA геном росли очень медленно, причем колонии стали видными спустя 7 дней выращивания при комнатной температуре. Все штаммы выращивали на M9 минимальной среде, дополненной 200 мкг/мл глутамина, 0,01 мкг/мл тиамина и с 20 мкг/мл триптофана или без него. Все трансформанты проверялись на наличие соответствующей плазмиды рестрикционным анализом. Все колонии, выращенные без триптофана, содержали клон 8-2, содержащий кДНК для мнимого кукурузного TrpA гена, что подтверждено Саузерн гибридизацией (данные не представлены). Эти результаты подтверждают вывод о том, что это кукурузный протеин. А - субъединицы триптофансинтазы.

Пример 20: Экспрессия гена

Характер экспрессии исследовали предпочтительно для сердцевины гена во всех частях растения. Исследовали также различные генотипы кукурузы для определения характера экспрессии этого гена. Для этих исследований были использованы следующие ткани в качестве источника РНК: верхняя, средняя и нижняя части сердцевины, опорные корни, початок, кочерыжка початка в генотипе 5N984; верхняя, средняя и нижняя части сердцевины, десятидневные листья, 14-дневные корни и сердцевина из целого растения для генотипа 211D, и

семена для генотипа 211D, которые были собраны с недельными интервалами (1-5 недель) после опыления. Нижнюю часть сердцевинны получали из, например, двух междуузлий над спорным корнем; среднюю часть получали из следующих трех междуузлий; верхняя часть представляла последние два междуузлия перед метелкой у 60-70-дневных растений. У растений в возрасте 39 дней было только два междуузлия, а у растения в возрасте 49 дней - только три. Нозерн блоттинг показал, что транскрипты, гибридизующиеся с зондом, полученным из сердцевинной кДНК, быстро накапливаются в молодой сердцевине и молодых листьях. По мере взросления растения, которые образует стебель, наблюдается существенное снижение количества транскрипта. См. фиг.25A-D. Ни в один из моментов времени не обнаруживали сигналов от этого гена в РНК, полученных из семян, ни в полной РНК или поли А+ РНК. См. фиг.26. Транскрипт был также обнаружен в корнях, в основании початков и оболочке, но не в столь же высоких уровнях, которые были обнаружены для тканей сердцевинны и молодых листьев. Некоторое количество сигналов поступало из опорных корней, но только лишь с очень низкими уровнями. См. фиг.25D. Были проанализированы шесть кукурузных недифференцированных каллюсов путем Нозерн блот анализа, и не было обнаружено экспрессии этого гена (данные не представлены) ни в одном из образцов каллюса. Уровень экспрессии этого гена чрезвычайно высок, так как можно детектировать очень сильный сигнал для зонда из TrpA гена 8-2 в сердцевине и листьях уже через 2 часа после экспонирования блота на пленке (фиг.25A). Количество полученной мРНК сравнимо с количеством, которое получают из фосфоенолпируват-карбоксилазного гена кукурузы, раскрытого Hudspeth et al., *Plant Mol. Biology*, 12: 579-589 (1989), другого высокоэкспрессивного гена кукурузы.

Экспрессия этого гена не постоянна с течением времени. Экспрессия очень высока в нижней и средней части сердцевинны растений, которым менее 60 дней, и быстро снижается вблизи верхушки растения. По мере увеличения возраста растения, например, после 70 дней роста, экспрессия падает до почти необнаруживаемых уровней, за исключением экспрессии в нижней части сердцевинны и в основании початков. Накопление транскрипта в молодых листьях почти столь же высоко, что и в нижней части сердцевинны, но экспрессия быстро

снижается и становится почти недетектируемой в листьях, возраст которых превышает 40 дней. Было обнаружено, что экспрессия в листьях меняется в зависимости от сезона выращивания.

Приводимые далее примеры 21-39 относятся к выделению, изучению и анализу экспрессии специфического для пыльцы промотора по способу настоящего изобретения.

Пример 21: Развитие растения кукурузы

Растения кукурузы (*Zea mays* Funk, инбредные, 211D) выращивают из семян на почвенной смеси из вермикулита и песка в оранжерее в режиме 16 часов света/8 часов темноты.

Пример 22: Выделение полного протеина пыльцы

Зрелую пыльцу выделяют из растений кукурузы во время максимального опадения пыльцы. Ее просеивают для удаления частиц, замораживают в жидком азоте, и 3-4 мл объема замороженной пыльцы измельчают в ступке пестиком с равным объемом 75-150 мкм стеклянных шариков. 40 мл измельчающего буфера (2 мМ ЕДТА, 5 мМ DTT, 0,1% SDS, 100 мМ Hepes, pH 8) добавляют, и полученную смесь снова измельчают. Стеклянные шарики и неповрежденные зерна пыльцы осаждают центрифугированием с низкой скоростью, и полученную смесь осветляют центрифугированием при 10000g в течение 15 минут. Протеин осаждают из надосадочной жидкости, добавляя ацетон до 90%.

Пример 23: Выделение эксинового протеина пыльцы

Эксиновый протеин выделяют из опавшей пыльцы кукурузы 211D по способу Matousek and Tupy, *J. Plant Physiology* 119: 169-178 (1985).

Пример 24: Выделение листовенного протеина

Молодые листья (раскрытые примерно на 60%) срезают с растения кукурузы, удаляют среднюю жилку. Выделяют полный протеин как и для пыльцы, за исключением того, что материал не замораживают; а измельчают в смесителе Waring без стеклянных шариков.

Пример 25: Выделение протеина зерен

Початки с полностью развитыми, но все еще влажными зернами, извлекают из растения, и зерна нарезают скальпелем. Полный протеин выделяют таким же способом, что и из листьев.

Пример 26: Гель-электрофорез протеинов кукурузы

Протеины пыльцы, листьев и зерен разделяют на SDS полиакриламидном геле по способу Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989). После подкрашивания голубым Coomassie проводят сравнение полос из пыльцы, листьев и зерен, и определяют, что протеины приблизительно 10 кД, 13 кД, 20 кД, 45 кД, 55 кД и 57 кД являются пыльце-специфическими.

Определение пыльце-специфических кДНК клонов

Пример 27: Частичное определение последовательности пыльце-специфических протеинов

Полосы протеинов, которые были определены как специфические для пыльцы, очищают электроблоттингом из полиакриламидного геля на PVDF мембране (Matsudaira P., J. Biol. Chem. 261: 10035-10038 (1987) или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. I-терминальную последовательность очищенных протеинов определяют автоматизированной деградацией Эдмана в газо-фазном секвенаторе Applied Biosystem 470A.

Фенилтиогидантоиновые (PTH) аминокислоты идентифицируют, используя PTH анализатор Applied Biosystems 120A. Для определения внутренней последовательности, протеины переваривают эндопротеиназой Lys-C (Boehringer Mannheim) в 0,1 М Tris-HCl, pH 8,5, в течение 24 часов при комнатной температуре, используя отношение энзим:субстрат 1:10. Полученные пептиды выделяют с помощью ВЭЖХ, используя колонку Аквапор 2-8, элюируя ее с линейным градиентом смеси ацетонитрил/изопропанол (1:1 отношение) (0 до 60%) в 0,1% TFA. Последовательность выделенных Lys-C пептидов определяют указанным ранее способом. Были получены следующие последовательности для 13 кД специфического для пыльцы протеина:

N-конец: TTPLTFQVGKGSKPGLILTPNVATI

LysC 61: KPGHLILTPNVATISDVVIK

LysC 54: SGGTRIADDVIPADFK

LysC 49: EHGGDDFSFTLK

LysC 43: EGPTGTWTLDTK

Пример 28: Синтез олигонуклеотидных зондов для специфических для пыльцы кДНК

Участки пептидной последовательности в протеине 13 кД с низким содержанием кодонов отбирают, и подходящие олигонуклеотидные зонды для гена, кодирующего эти участки, синтезируют на синтезаторе Applied Biosystems 380A.

Были синтезированы следующие олигонуклеотиды:

Олиго #51 5'-AA ATC ATC ACC ACC ATG TTC-3'

G G G G C

T

C

Олиго #58 5'-CC TTT ACC CAC TTG AAA-3'

C G C G

T

C

где столбцы олигонуклеотидов представляют основания, которые статически включены в равных соотношениях в указанные положения олигонуклеотидов. Олигонуклеотид #51 кодирует аминокислотную последовательность EHGGDDF, найденную в пептиде Lys-C 49, а олигонуклеотид #58 кодирует аминокислотную последовательность FQYGKG, найденную в пептидном N-конце. Использование этих смешанных олигонуклеотидов для скринирования кДНК библиотеки для пыльце-специфического гена, будет описано далее.

Пример 29: Конструирование кДНК библиотеки пыльцы кукурузы

Полную РНК кукурузы из опадающей пыльцы кукурузы 211D выделяют, как описано Glisen et al., Biochemistry, 13: 2633-2637 (1974). Поли А+ мРНК очищают из полной РНК, как указано у Sambrook et al. Используя эту мРНК, получают кДНК, с помощью набора для синтеза кДНК; поставляемого Promega, в соответствии с указаниями изготовителей. EcoRI линкеры добавляют к кДНК и лигируют в нити клонирующего вектора лямбда Zap, поставляемого Stratagene, и используя указания изготовителя. Продукт лигирования упаковывают в лямбда пакующий экстракт, также поставляемый Stratagene, и используют для инфицирования E.coli BB4 клеток.

Пример 30: Выделение специфических для пыльцы кДНК клонов

Библиотеку кДНК пыльцы кукурузы зондируют, используя зонды синтетических олигонуклеотидов, специфические для гена протеина 130 кД, как указано у Sambrook et al. около 100000 фаговых бляшек кДНК библиотеки пыльцы культивируют, а затем снимают на нитроцеллюлозные фильтры. Эти фильтры зондируют, используя олигонуклеотиды #51 и #58, которые были мечены на концах 32Р, с использованием полинуклеотидкиназы. Эти зонды гибридизуют на фильтры в мягких условиях (50°С в 1М NaCl, 10% декстрансульфата, 0,5% SDS), промывают при комнатной температуре, а затем 30 минут при 45°С в 6X SSC, 0,1% SDS и экспонируют на рентгеновской пленке для идентификации положительных клонов. Предполагаемые клоны очищают в четырех раундах гибридизации бляшек. Выделяют три класса кДНК клонов. Тип I содержит EcoRI фрагменты 0,2 т.п.о. и 1,8 т.п.о. Тип II содержит EcoRI фрагменты 0,6 т.п.о., 0,5 т.п.о. и 1,0 т.п.о., а тип III содержит EcoRI фрагмент 2,3 т.п.н.

Пример 31: Изучение специфических для пыльцы кДНК клонов

EcoRI фрагменты типа II кДНК клона субклонировать в плазмидный векторный pBluescript SK+, поставляемый Stratagene. См. фиг.30. 0,6 т.п.о. фрагмент в pBluescript обозначен II-0,6; 0,5 т.п.о. фрагмент в pBluescript обозначен II-0,5 (позднее его переименовали в pCIB3169), а 1,0 т.п.о. фрагмент в pBluescript обозначен II-1,0 (позднее его переименовывают в pCIB3168). Как будет раскрыто далее, 0,5 т.п.о. и 1,0 т.п.о. фрагменты кодируют кукурузный специфический для пыльцы кукурузы СДРК ген. РНК из тычинок, пыльцы, листьев, корней и метелок денатурируют глиоксалем, обрабатывают электрофоретически на 1% агарозном геле, переносят на нитроцеллюлозу, и зондируют отдельно тремя EcoRI фрагментами, которые были мечены 32Р статистическим удалением праймеров, как было указано у Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York (1989). Блоты экспонируют на рентгеновской пленке и идентифицируют мРНК полосу приблизительно 1,5 т.п.о. с помощью 0,6 т.п.о. фрагмента зондом, тогда как 0,5 и 1,0 т.п.о. фрагменты гибридизованы с приблизительно 2,0 т.п.о. мРНК. Во всех случаях гибридизация видна только для РНК пыльцы,

за исключением 0,6 т.п.о. фрагмента, который дает незначительный сигнал на другой мРНК. Из этих трех результатов можно сделать вывод, что исходный кДНК клон представляет собой слитую кДНК молекулу, полученную из двух различных мРНК. 0,6 т.п.о. фрагмент является частью кДНК 1,5 т.п.о. специфической для пыльцы мРНК, а эта мРНК кодирует пептиды Lys-C 49 и N-конец. 1,0 и 0,5 т.п.о. фрагменты составляют часть кДНК 2,0 т.п.о. специфической для пыльцы мРНК не связанной с пептидами и олигонуклеотидными зондами, которые использовали в качестве зондов. Этот вывод был проверен, когда фрагменты были секвенированы с использованием способа терминации дидеокси цепей, по способу Sambrook et al. кДНК последовательность изображены на фиг.31.

Пример 32: Определение специфичности мРНК экспрессии

Для определения того, присутствует ли 2,0 т.п.о. РНК, представленная кДНК клоном rCIB3160 и rCIB3168, только в пыльце, полную РНК выделяют из корней кукурузы 211D, из листьев, пыльцы, тычинок или метелок. РНК денатурируют глиоксалем, обрабатывают электрофоретически на 1% агарозном геле, переносят на нитроцеллюлозу и зондируют 32Р меченой EcoRI вставкой из плазмид rCIB3168 или rCIB3169, каждый раз используя стандартные методики Sambrook et al. Экспонирование этого блота на фотографической пленке демонстрирует, что ген, представленный этими двумя клоном, всего лишь транскрипционно активен в пыльце (фиг.32).

Идентификация пыльце-специфического промотора

Пример 33: Конструирование геномной ДНК библиотеки кукурузы

Геномную ДНК из кукурузы линии 211D (молодые побеги) выделяют по способу Shure et al., Cell, 35: 225-233 (1983). ДНК поставляет Stratagene, это геномная ДНК библиотека была сконструирована за счет клонирования Sau3AI частично переваренной ДНК в вектор клонирования Lambda Dash Stratagene.

Пример 34: Блот гибридизация геномной ДНК для определения количества копий гена

Геномную ДНК из кукурузы линии 211D обрабатывают рядом рестриктаз, отдельные перевары обрабатывают электрофоретически на агарозном геле, переносят на нитроцеллюлозу и зондируют 32Р-меченой EcoRI вставкой из

плазмиды pCIB3168 (1,0 т.п.о. фрагмент), pCIB3169 (0,5 т.п.о. фрагмент) или клона П-0,6, используя стандартные методики, описанные Sambrook et al. Более 10 полос было детектировано П-0,6 зондом на большинстве переваров, что указывает на то, что эта кДНК получена из большого, мультигенного семейства. Зондируя 1,0 т.п.о. фрагментом, детектированным из 3-6 полос, и зондируя 0,5 т.п.о. фрагментом, детектированным только из 1-3 полос, которые были субсетом тех, которые детектировались 1,0 т.п.о. фрагментом. Из-за меньшего размера семейства генов, детектируемых 1,0 т.п.о. и 0,5 т.п.о. фрагментами, было решено попытаться выделить соответствующий им геномный клон.

Пример 35: Выделение специфического для пыльцы геномного клона

Геномную библиотеку кукурузы 211D Stratagene скринируют, зондируя снятые бляшки 32P-мечеными вставками из плазмиды pCIB3168 (1,0 т.п.о. фрагмент) и pCIB3169 (0,5 т.п.о. фрагмент), используя стандартные процедуры, как указано в руководстве Stratagene, сопровождающем библиотеку. Используя такую стратегию, выделяют лямбда клон MG14, и его гибридизуют с обоими зондами. 9,0 т.п.о. BamHI фрагмент MG14, которые также гибридизуют с обоими зондами, субклонируют в BamHI сайт pBluescript SK+ для создания плазмиды pCIB379. 1800 п.о. из pCIB379, участок, соответствующий кДНК последовательности, секвенируют, как указано ранее. Сравнение кДНК геномных последовательностей показывает всего лишь 91% идентичности. pCIB379 вставка представляет родственный специфический для пыльцы ген.

Вторую кукурузную 211D геномную библиотеку конструируют в векторе лямбда GEM-11, поставляемой Promega, используя прилагаемое руководство. Скринирование этой неамплифицированной библиотеки описанным ранее способом, приводит к получению клона GEM11-1, который гибридизуют с обоими 0,5 и 1,0 т.п.о. зондами. 20 т.п.о. HindIII фрагмент GEM11-1, который также гибридизуют с обоими зондами, субклонируют в HindIII сайт pBluescript SK+ до получения pCIB3166. ДНК последовательность 4,1 т.п.о. pCIB3166 определяют (фиг.36), и после учета шести интронов в геномном клоне, оказывается на 100% идентичной ДНК последовательности pCIB3168 и pCIB3169. Сравнение pCIB3166 последовательности с базой данных банка Genbank/EMBL выявляет, что 5' часть через 3 эксона, оказывается на 34,6%

идентичной калмодулин-зависимой протеинкиназе II крысы на уровне аминокислот (фиг.33), хотя 4-7 экзоны оказались на 39,4% идентичны калмодулину крысы. (См. фиг.34.) Никаких других специфических для пыльцы киназ не было описано, и в это время не был известен этот протеин, комбинирующий киназу и калмодулиновые домены. Соответственно, Harper et al., Science 252: 951-954 (1991) раскрыл кДНК последовательность аналогичного протеина сои, хотя этот ген не специфичен для пыльцы в экспрессии. Сравнение кальций-зависимой протеинкиназы (СДРК) сои и СДРК пыльцы кукурузы выявляет 38% идентичности на аминокислотном уровне. (См. фиг.35.)

Пример 36: Идентификация промоторных сайтов начала транскрипции удлинением праймеров

Олигонуклеотид PE51 со следующей последовательностью был синтезирован в качестве праймера:

5'-TGGCCCATGGCTGCGGCGGGGAACGAGTGCGGC-3'

Анализ удлинением праймера проводят на полиА+ мРНК пыльцы, по способу Metraux et al., PNAS USA 86: 896-890 (1989). Сайт инициирования транскрипции, как определяют, должен быть между основаниями 1415 и 1425 на частичной последовательности pCIB3166, представленной на фиг.36.

Тестирование промоторных функций в трансгенных растениях

Пример 37: Конструирование промоторных векторов для трансформации растений

Для демонстрации того, что СДРК промотор пыльцы может управлять экспрессией связанного гена в трансгенном растении, конструируют генное слияние промотора СДРК пыльцы с геном Бета-глюкуронидазы E.coli. BamHI фрагмент размером 10 т.п.о. из лямбда GEM11-1, содержащий первый экзон и часть первого интрона гена СДРК пыльцы плюс 9 т.п.о. гена, субклонируют в BamHI сайт pBluescript SK+ для создания плазмиды pCIB3167. BamHI-HindIII фрагмент pCIB3167 размером 2,3 т.п.о. субклонируют в BamHI и HindIII сайты pBluescript SK+ для создания плазмиды pSK105. pSK105 обрабатывают Aval и HindIII, и HindIII-Aval фрагмент размером 1,75 т.п.о. выделяют на агарозном геле. PCR реакцию ведут в стандартных условиях по Sambrook et al., используя интактную pSK105 в качестве матрицы, и следующие праймеры:

#42: 5'-AGCGGTCGACCTGCAGGCATGCGATCTGCACCTCCCGCCG-3'

#43: 5'-ATGGGCAAGGAGCTCGGG-3'

Продукты PCR реакции обрабатывают *Ava*I и *Sall*, и полученные фрагменты выделяют на агарозном геле. *pBluescript SK+* обрабатывают *Hind*III и *Sall*. *Hind*III-*Ava*I фрагмент размером 1,75 т.п.о., полученный с помощью PCR *Ava*I-*Sall* фрагмент, и *pBluescript* вектор с *Hind*III и *Sall* концами лигируют в трехстадийном лигировании для создания плазмиды *pSK110*.

Слияние промоторного фрагмента с геном в *pSK110* бетаглюкуронидазы (*GUS*) создают, обрабатывая *pSK110* с *Hind*III и *Sall*, выделяя 1,9 т.п.о. фрагмент на агарозном геле, и лигируя его в *Hind*III и *Sall* сайты *pCIB3054*, для создания плазмиды *pKL2*, плазмиды, полученной из *pUC19*, содержащей *GUS* ген с растительным интроном из *PEPC* гена кукурузы и полиА сигналом из вируса мозаики цветной капусты. Это промоторное слияние оказывается неактивным в растениях, вероятно из-за наличия *ATG* вне рамки в лидерной последовательности, предшествующей *GUS* гену *ATG*.

Функциональное слияние промотора создают за счет переваривания *pKL2* с *Xba*I и *Sall* для удаления предшествующего слияния. Новое слияние получают в PCR реакции с использованием *pKS105* в качестве матрицы и следующих праймеров:

#SK50: 5'-CCCTTCAAAATCTAGAAACCT-3'

#SK49: 5'-TAATGTCGACGAACGGCGAGAGATGGA-3'

PCR продукт обрабатывают *Xba*I и *Sall*, очищают на агарозном геле. Очищенный фрагмент лигируют в *Xba*I и *Sall* сайты *pKL2* для создания плазмиды *pCIB3171*. Эта плазида содержит функциональное слияние СДРК промотора пыльцы и *GUS*, которое управляет экспрессией *GUS* гена исключительно в пыльце.

Для создания вектора, содержащего слияние промотор СДРК пыльцы-*GUS*, подходящее для использования в *Agrobacterium tumefaciens*. При этом ген слияния выделяют из *pCIB3171* за счет обработки *Hind*III и *Sall*.

Полученный фрагмент лигируют в *Hind*III и *Sall* сайты *pBII01* (поставляется Clontech) для создания плазмиды *pCIB3175*.

Пример 38: Получение трансгенных растений

pCIB3175 трансформируют Agrobacterium tumefaciens, содержащую хелперную плазмиду pCIB542, и полученную культуру используют для трансформации листовых дисков из культуры кончика ростка табака по способу Horsch et al., Science, 227: 1229-1231 (1985), за исключением того, что опускают выращивание культур, и отбор ведут на 100 мг/л канамицина. Трансгенные растения регенерируют и проверяют на присутствие трансгена с помощью PCR.

Пример 39: Анализ экспрессии GUS гена

Пыльцу от первичных трансформантов и из потомства анализируют гистохимически на экспрессию GUS гена по способу Guerrero et al., Mol. Gen. Genet., 224: 161-168 (1990). Процент зерна пыльцы экспрессирующих GUS ген, по данным голубого подкрашивания в X-глюканбуфере, представлен ниже.

Номер растения	% голубой пыльцы
PP1-51	28 %
PP1-54	54 %
PP1-55	нет
PP1-61	очень мало
PP1-63	51 %
PP1-67	15 %
PP1-80	10 %
PP1-83	12 %

Первичные трансформанты, в которых отдельный ген промотор СДРК пыльцы-GUS был интегрирован, будут продуцировать максимум 50% GUS позитивной пыльцы из-за сегрегации одного гена.

Флуориметрический GUS анализ проводят для тканей пыльцы, стебля, корня листьев и пестика отобранных растений для демонстрации специфичности экспрессии СДРК промотора пыльцы. Анализы проводят по способу Jefferson, Plant Mol. Biol., 14: 995-1006 (1990), и величины GUS активности выражают в нмолях MU/мкг протеина/мин,

Номер растения	Ткань	GUS активность	GUS активность не-трансф. раст.	Чистая GUS активность
PP1-51	стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
	корень	0,15	0,10	0,05
	пестик	0,02	0,01	0,01
	пыльца	0,24	0,02	0,22
PP1-54	стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
	корень	0,13	0,1	0,03
	пестик	0,01	0,01	0
	пыльца	0,60	0,02	0,58
PP1-63	стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
	корень	0,07	0,1	0
	пестик	0,01	0,01	0
	пыльца	0,57	0,02	0,55

Примеры 40-50 направлены преимущественно на получение химерных конструкций, то есть рекомбинантных ДНК молекул, содержащих конституи- тивные, ткане-предпочтительные или ткане-специфические промоторы, операбельно связанные с рассматриваемым Bt геном, включение их в векторы, получение трансгенных растений, содержащих эти векторы, и анализ уровней экспрессии Bt протеинов трансгенных растений.

Пример 40: Конструирование оптимизированных для кукурузы Bt векторов трансформации

Для демонстрации эффективности синтетического Bt cryIA(b) гена в кукурузе, PerC и сердцевина-специфические промоторы сливают с синтети- ческим Bt cryIA(b) геном, используя PCR. Олигомеры, сконструированные для PCR слияний:

(PERC)

KE99A28 = 5'-TGCGGTTACC GCCGATCAGATG-3'

KE97A28 = 5'-GCGGTACCGC GTCGACGCGG ATCCCGCGGC GGAAGCTAAG-3'
(PITH)
KE100A28 = 5'-GTCGTCGACC GCAACA-3'
KE98A28 = 5'-GCGGTACCGC GTTAACGCGG ATCCTGTCCG ACACCGGAC-3'
KE104A28 = 5'-GATGTCGTCG ACCGCAACAC-3'
KE103A28 = 5'-GCGGTACCGC GGATCCTGTC CGACACCGGA CGGCT-3'

PCR праймеры конструируют для замены NcoI сайтов в 5' нетранслируемом лидерном участке каждого из этих ткане-специфических генов (содержащих ATG трансляционный стартовый сайт с BamHI сайтами для облегчения клонирования синтетического cryIA(b) гена в этот BamHI сайт. Последующее конструирование векторов, содержащих ткане-специфические промоторы, слитые с синтетическим cryIA(b) геном, и также содержащие 35S:PAT:35S маркерный ген, включает несколько промежуточных конструкций.

1. pCIB4406 (35S:синтетический-cryIA(b):pepC ivs#9:35S)

pCIB4406 содержит BamHI/ClaI синтетический cryIA(b) ген размером 2 т.п.о., слитый с CaMV 35S промотором (Rothstein et al., Gene, 53: 153-161 (1987)). Этот ген содержит также интрон #6, полученный из кукурузного гена РЕР карбоксилазы (ivs #9) в 3' нетранслируемом участке этого гена, который использует CaMV 3' конец [PNAS USA, 83: 2884-2888 (1986); Hudspeth et al., Plant Molecular Biology, 12: 579-589 (1989)]. pCIB4406 лигируют и трансформируют штамм E.coli "SURE" (Stratagene, La Jolla, CA), как было указано ранее. Одну мутацию находят в pCIB4406 cryIA(b) гене по аминокислоте #436, что приводит к замене целевого Phe на Leu. pCIB4406 полностью активен в отношении мотылька кукурузного, при тестировании в биоанализе насекомых и продуцирует CryIA(b) протеин ожидаемого размера по данным вестерн блот анализа.

2. pCIB4407 (35S:синтетический-cryIA(b):pepC ivs#9:35S + 35S:PAT:35S)

pCIB4407 получают из HindIII/EcoRI фрагмента размером приблизительно 4 т.п.о., содержащего 35S:PAT:35S гена, и HindIII/EcoRI 35S: синтетический CryIA(b):35S гена из pCIB4406 размером 3,1 т.п.о. pCIB4407 лигируют и трансформируют в штамм E.coli "SURE", DH5альфа и HB101, используя

стандартные процедуры (Sambrook et al.). Синтетический cryIA(b) ген обладает теми же свойствами, что и предшественник pCIB4406.

3. pCIB4416 (35S:синтетический-CryIA(b):pepC ivs#9:35S + 35S:PAT:35S + 35S:Adh интрон:GUS:35S.)

pCIB4407 обрабатывают EcoRI и щелочной фосфатазой кишечника теленка (CIP) в стандартных условиях (Sambrook et al.) до получения фрагмента размером примерно 7,2 т.п.о., который лигируют с EcoRI 35S:Adh/GUS:35S фрагментом размером 3,4 т.п.о. до получения pCIB4416. Лигирование и трансформация в "SURE" клетки описаны далее. Синтетический cryIA(b) ген в pCIB4416 обладает теми же свойствами, что и ген в pCIB4406.

4. pCIB4418 (35S:синтетический-cryIA(b):pepC ivs#9:35S)

pCIB4406 обрабатывают ApaI и BamHI и CIP. pCIB4406 обрабатывают BamHI и NspI. pBS123#13 обрабатывают NspI и ApaI. Осуществляют трехстадийное лигирование, ApaI/BamHI фрагмента pCIB4406 размером 4,3 т.п.о., BamHI/NspI фрагмента pCIB4406 размером 1,3 т.п.о., и NspI/ApaI фрагмента из pBS123#13 размером 170 п.о. до получения pCIB4418. Штаммом хозяином для pCIB4418 является E.coli HB101.

5. pCIB4419 (35S:синтетический-cryIA(b):pepC ivs#9:35S + 35S:PAT:35S + 35S:Adh интрон:GUS:35S.)

pCIB4416 и pCIB4418 обрабатывают Bst E II и Eco NI, а фрагменты pCIB4416 - CIP. Фрагмент pCIB4416 размером 9,1 т.п.о. лигируют с фрагментом pCIB4418 размером 1,4 т.п.о. до получения pCIB4419. pCIB4419 трансформированная в компетентные E.coli HB101, демонстрирует полную активность в биоанализе насекомых против мотылька кукурузного.

6. pCIB4420 (сердцевина: синтетический-cryIA(b):PEPC ivs#9:35S + 35S:PAT:35S)

Промежуточными конструкциями при получении pCIB4420 является pBTin1, pBTin2, p4420A и pBTin3. pBTin1 (промотор сердцевины: вторая половина синтетического Vt гена + 35S:PAT:35S) получают лигированием XbaI/NcoI фрагмента размером 2,1 т.п.о. промотора сердцевины из плазмиды (3-1) с XbaI/NcoI фрагментом pCIB4407 размером 5,2 т.п.о. pBTin2 является промежуточной конструкцией, содержащей промотор сердцевины, модифициро-

ванный PCR фрагментом размером 210 п.о., полученным с использованием KE100A28 и KE98A28, перечисленных ранее. PCR реакционная смесь содержит приблизительно 100 нг BamHI/NcoI фрагмента промотора сердцевины размером 2,1 т.п.о. со 100 пмолями каждого олигомера, 200 нМ каждого dNTP, 1 X буфер (Cetus) и 2,5 ед. термостабильной полимеразы. Так как T_m относительно низка (между 40 и 50°C), PCR реакции ведут со следующими параметрами:

цикл денатурирования: 94°C в течение 1 минуты

цикл отжига: 37°C в течение 1 минуты

цикл удлинения: 72°C в течение 45 секунд (+ 3 сек на цикл)

число циклов: 25.

PCR реакционную смесь обрабатывают протеиназой К, как описано ранее, а затем SalI/KpnI с последующей экстракцией смесью фенол/хлороформ и осаждают этанолом, как описано ранее. Фрагмент размером 210 п.о. очищают на 2% Nusieve геле и экстрагируют из геля, используя фильтр Millipore. SalI/KpnI фрагмент размером 210 п.о. лигируют с SalI/KpnI фрагментом размером 4,9 т.п.о. из сердцевины (3-1) до получения pBtin2. pp4420A (сердцеви-на:синтетический-Bt:Пер интрон:35S + 35S:PAT:35S) получают в трехстадийном лигировании NsiI/BamHI фрагмента pBtin2 размером 700 п.о., BamHI/Bst E II фрагмента pCIB4418 размером 1,8 т.п.о., и Bst E II/NsiI фрагмента pBtin1 размером 5,9 т.п.о. После получения p4420A обнаруживают три мутации в pBtin2. Второй PCR фрагмент приготавливают для модификации NcoI сайта в лидере для сердцевины, используя праймеры KE104A28 и KE103A28 с T_m значениями около 65°C. PCR реакционная смесь идентична той, которая перечислена ранее с добавлением глицерина до 20% для снижения мутаций в G+C обогащенных участках (Henry et al., Plant Molecular Biology Reporter, 9(2): 139-144 (1991). PCR параметры следующие:

Файл I: 94°C : 3 минуты, 1 цикл

Файл II: 60°C : 1 минута

94°C : 1 минута

25 циклов

Файл III: 72°C : 5 минут, 1 цикл

PCR рестрикционные смеси обрабатывают, как указано ранее, и обрабатывают рестриктазами Sall и KpnI. Sall/KpnI PCR (глицерин в реакции) фрагмент размером 210 п.о. лигируют с Sall/KpnI фрагментом плазмиды сердцевины (3-1) размером 4,9 т.п.о. до получения pBtin3. Сведения о последовательности pBtin3-G#1 показывают, что этот PCR полученный фрагмент правилен.

pBtin3-G#1 используют для получения pCIB4420 (также называемый p4420B "G#6"). pCIB4420 конструируют трехстадийным лигированием, NsiI/BamHI фрагмента pBtin3-G#1 размером 700 п.о., BamHI/Bst E II фрагмента pCIB4418 размером 1,8 т.п.о., Bst E II/NsiI фрагмента pBtin1 размером 5,9 т.п.о. pCIB4420 используют в экспериментах с мезофильным протопластом, и демонстрируют полную активность синтетического cryIA(b) гена в отношении мотылька кукурузного.

7. pCIB4413 (PEPC:синтетический-Bt (Phe мутация):PEPC интрон:35S.)

Фрагмент слияния создают с помощью PCR, используя праймеры KE99A28 в KE97A28 с HindIII/Sall матрицей pGUS4.5 размером 2,3 т.п.о. PCR смесь содержит ту же самую концентрацию праймеров, матрицы, dNTP, солей и термостабильной полимеразы, как указано ранее. Параметры PCR реакции следующие:

цикл денатурации: 94°C в течение 1 минуты

цикл отжига: 55°C в течение 1 минуты

цикл удлинения: 72°C в течение 45 секунд (+3 сек на цикл)

количество циклов: 30.

После завершения PCR реакционные смеси обрабатывают протеинкиназой K, затем экстрагируют смесью фенол/хлороформ, и осаждают этанолом, как указано ранее, для обработки рестриктазой BamHI и Bst E II.

pCIB4413 получают трехстадийным лигированием, BamHI/Bst E II PCR фрагмента размером 210 п.о., BamHI/HindIII фрагмента pCIB4406 размером 4,7 т.п.о., и HindIII/Bst E II фрагмента pGUS4.5 размером 2,2 т.п.о.

8. pCIB4421 (PEPC:синтетический-cryIA(b):PEPC интрон:35S.)

pCIB4421 получают для замены синтетического гена, содержащего Phe мутацию в pCIB4413 без синтетического CryIA(b) гена из pCIB4419. pCIB4421 получают лигированием BamHI/SacI фрагмента pCIB4413 размером 5,1 т.п.о. с BamHI/SacI фрагментом pCIB4419 размером 1,9 т.п.о.

9. pCIB4423 (PEPC:синтетический-cryIA(b):PerC интрон:35S + 35S:PAT:35S)

BamHI/HindIII PEPC фрагмент промотора pCIB4421 размером 2,4 т.п.о. лигируют с BamHI/HindIII фрагментом размером 6,2 т.п.о. в pCIB4420 до получения pCIB4423. HindIII сайт разрушают экзонуклеазами в pCIB4423. pCIB4423 содержит синтетический cryIA(b) ген под контролем PEPC промотора и PAT ген под контролем 35S промотора.

10. Синтетический cryIA(b) ген в штаммах Agrobacterium:

Штаммы Agrobacterium, содержащие синтетический cryIA(b) ген, позволяют осуществлять перенос этого гена в ряд двудольных растений. Вектор pCIB4417 Agrobacterium содержит HindIII/EcoRI 35S: синтетический-cryIA(b):PEPC:ivs#9:35S фрагмент размером 3,3 т.п.о. pCIB4406 (Phe мутация) лигированный с фрагментом HindIII/EcoRI pBI101 размером 14 т.п.о. (Clontech). Используя электропорацию, pCIB4417 переносят в A. rumefaciens штамм LBA4404 (Diethard et al., Nucleic Acids Research, vol.17: #16: 6747, 1989).

200 нг pCIB4417 и 40 мкл оттаявших на льду LBA4404 компетентных клеток подвергают электропорации в предварительно охлажденной 0,2 см кювете для электропорации (Bio-Rad Laboratories, Ltd.). Используя Gene Pulser-ТМ с блоком контроля импульсов (Bio-Rad), электрический импульс прилагают сразу же, устанавливая напряжение в 2,5 кV, при емкости 25 едФарад. После импульса клетки немедленно переносят в 1 мл YEB среду, и встряхивают при 27°С в течение 3 часов перед культивированием 10 мкл на АВmin:Km50 пластинах. После инкубирования при 28°С в течение примерно 60 часов, колонии отбирают для минискринирования для проведения рестрикционного энзимативного анализа. Окончательный Agrobacterium штамм обозначают pCIB4417:LBA4404.

Пример 41: ELISA анализ трансформированных кукурузных протопластов

Наличие cryIA(b) протеина токсина определяют, используя иммуноферментный анализ (ELISA). Этот анализ очень чувствителен, и служит специфическим анализом для антигенных материалов. ELISA анализы весьма полезны для определения экспрессии генных продуктов. Антисыворотка для этих анализов производится в ответ на иммунизацию кроликов градиентно-очищенными Bt кристаллами [Ang et al., *Applied Environ. Microbiol.*, 36: 625-626 (1978)] солюбилизованными натрийдодецилсульфатом. ELISA анализы экстрактов из транзитно трансформированных клеток кукурузы проводят, используя стандартные процедуры (см., например, Harlow E. и Lane D. в "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). ELISA методики описаны далее Clark et al., *Methods in Enzymology*, 118: 742-766 (1986); и Bradford, *Anal. Biochem.*, 72: 248 (1976). Таким образом, эти процедуры хорошо известны специалистам.

Анализы ELISA осуществляют для определения продуцирования CryIA(b) протеина в протопластах кукурузы. Протеины продуцируются, как сообщается, в количестве, менее чем нг Bt на мг полного протеина (нг Bt/мг). Каждую конструкцию тестируют дважды.

pCIB3069	Bt не детектируется (оба теста)
pCIB4407	21900 нг Bt/мг полного протеина
	2100 нг Bt/мг полного протеина

Трансформированные клетки кукурузы продуцируют с высокими уровнями порядка приблизительно 20000 нг Bt CryIA(b) протеина на мг полного растворимого протеина, Bt IP, если они трансформированы оптимизированным для кукурузы Bt геном. Уровень детектирования этих ELISA анализов составляет около 1-5 нг CryIA(b) протеина на мг протеина. Поэтому оптимизированный для кукурузы Bt ген продуктивен приблизительно в 20000 раз сильнее в экспрессии этого протеина в клетки кукурузы.

Пример 42: Анализ экстракта из трансформированных протопластов на инсектицидную активность против мотылька кукурузного

Вестерн блот анализ проводят также используя экстракты, полученные из клеток кукурузы, которые были транзитно трансформированы ДНК для экспрессии оптимизированного для кукурузы гена. При исследовании вестерн-

блоттингом оказывается, что этот протеин идентичен протеину, продуцируемому *E.coli*. Напротив, как было показано в примере 6 ранее, Bt cryIA(b) инсектицидный протеин не продуцируется в детектируемых количествах кукурузными клетками, трансформированными контрольными векторами, при попытке экспрессировать нативный, полученный из Bt, кодирующий участок.

Качественные тесты по токсичности для насекомых можно провести, используя собранные протопласты. Приготавливают суспензии для каждого репликата, тестируемого во всех биоанализах. Репликат считают позитивным, если он вызывает значительно большую гибель, нежели контроль. Так, например, репликаты тестируют по их активности против насекомых отряда чешуекрылых, используя мотылька кукурузного, *Ostrinia nubilalis*. 100 мкл суспензии протопластов в 0,1% Triton X-100 помещают пипеткой на поверхность искусственного корма гусениц черной совки (Bioserv. Inc., Frenchtown, NJ; F9240) в чашках петри размером 50 мм × 10 мм. После сушки воздухом 10 новорожденных личинок помещают в каждую чашку. Гибель определяют через 4 дня. Если этот протеин дают мотыльку кукурузному, он вызывает 100% гибели.

Пример 43: Экспрессия синтетического Bt в мезофильных протопластах кукурузы

Общая процедура для выделения мезофильных протопластов кукурузы взята из Sheen et al., *The Plant Cell*, 2: 1027-1038 (1990). Систему трансформации протопластов, предложенную Sheen et al., модифицируют, используя скорее трансформацию за счет PEG, нежели электропорацию. Эта процедура, а также проведенные изменения в процедуре выделения, описываются далее.

Выделение/трансформация мезофильных протопластов кукурузы

1. Стерилизованные и пророщенные зерна кукурузы сеют для получения листового материала. Сеянцы выращивают на свету при 25°С.
2. Поверхностно стерилизуют кусочки листьев с 10-12-дневных сеянцев 5% хлороксом в течение 5 минут, а затем несколько раз промывают стерильной дистиллированной водой.
3. Делят на аликвоты раствор энзима (см. рецепт далее); 25 мл/чашку (100×25 мм чашки петри).

4. Удаляют избыточную воду с листьев и помещают 6-8 двухдюймовых (5 см) кусочков в каждую чашку с энзимом. 14 пластин обычно используют с листовым материалом от около 100 семян.
 5. Нарезают листья на длинные полоски насколько возможно более тонкие (2-5 мм).
 6. Встряхивают медленно при 25°С в течение 6,5-7 часов. Покрывают пластины так, чтобы инкубирование происходило в темноте.
 7. Перед фильтрованием протопластов промывают 100 мкм сита 10 мл 0,6М маннитола. Протопласты медленно пропускают через сита с помощью пипетки. Промывают пластины 0,6М маннитола, чтобы собрать все оставшиеся в чашках протопласты.
 8. Фильтруют жидкость осторожно в 50 мл стерильные ампулы. Добавляют равные объемы по 0,6М маннитола для разбавления.
 9. Вращают в течение 10 минут при 1000 об/мин/500 г в центрифуге (Beckman Model TJ-6).
 10. Удаляют раствор энзима и сливают. Повторно суспендируют осадок в 5 мл маннитола. Собирают несколько осадков. Доводят объем до 50 мл 0,6М маннитолом и вращают.
 11. Повторно суспендируют до известного объема (50 мл) и считают.
 12. После счета и осаждения повторно суспендируют протопласты при концентрации 2 млн/мл в повторно суспендирующем буфере (состав дан далее). Оставляют ррts для инкубирования в повторно суспендирующем буфере на, по крайней мере, 30 минут перед трансформацией.
- Трансформация:
1. Помещают равные количества плазмид в ампулы (Fisherbrand полистирол 17×100 мм культуральные ампулы Snap Cap); по крайней мере, три репликата на каждую обработку; используют эквимоллярные количества плазмид так, чтобы равные количества генных копий можно было сравнить.
 2. Добавляют 0,5 мл протопластов и 0,5 мл 40% PEG с 0,6М маннитола.
 3. Осторожно встряхивают для перемешивания и инкубируют при 25°С в течение 30 минут.

4. Добавляют культуральную среду протопластов с 5-минутными интервалами, 1, 2, 5 мл.
5. Вращают в течение 10 минут при 1000 об/мин/500 г.
6. Удаляют жидкость из осадка, и повторно суспендируют в 1 мл культуральной среды (BMV среда).
7. Инкубируют в течение ночи при 25°С в темноте.

Состав:

Энзимный раствор

0,6М маннитол

10 мМ MES, pH 5,7

1 мМ CaCl₂

1 мМ MgCl₂

0,1% BSA

стерилизуют на фильтре.

К этому раствору добавляют следующие энзимы:

1% целлюлозы RS, и 0,1% Macerozyme R10

Промывочный буфер: 0,6М маннитола, стерилизован на фильтре.

Ресуспендирующий буфер: 0,6М маннитола, 20 мМ KCl, стерилизация на фильтре.

Культуральная среда: BMV среда, состав от Okuno et al., Phytopathology, 67: 610-615 (1977).

0,6М маннитола

4 мМ MES, pH 5,7

0,2 мМ KH₂PO₄

1 мМ KNO₃

1 мМ MgSO₄

10 мМ CaCl₂

1X K3 микроэлементы питания

стерилизация на фильтре.

ELISA анализ трансформированных протопластов проводят через день после трансформации. ELISA проводят в соответствии с описанным ранее. Следующие три эксперимента проводят с кукурузной инбредной линией 211D.

Естественно, другие линии кукурузы также могут быть использованы. Используют 50 ед./плазмиды pCIB4419 и эквимоллярные количества других плазмид. Полное количество растворимого протеина определяют, используя BioRad протеиновый анализ. (Bradford, Anal. Biochem. 72: 248 (1976).

Эксперимент трансформации:

Тестируемые конструкции:

1. pCIB4419 (Конструкция содержит синтетический Vt под контролем CaMV 35S промотора и 35S/PAT и 35S/GUS маркерных генов).

2. pCIB4420 (Конструкция содержит синтетический Vt под контролем сердцевинного промотора и PAT маркерного гена).

3. pCIB4421 (Конструкция содержит синтетический Vt под контролем PERC промотора).

4. pCIB4423 (Конструкция содержит синтетический Vt под контролем PERC промотора и PAT маркерного гена).

(PERC:синтетический-cryIA(b):PerC интрон:35S + 35S:PAT:35S)

В следующих экспериментах, 10- или 11-дневные сеянцы 211D анализируют для получения Vt CryIA(b) протеина в Biorad протеиновом анализе.

Эксперимент 1 (11-дневные сеянцы):

pCIB4419	15000 ± 3000 нг Vt/мг протеина
pCIB4420	280 ± 65 нг Vt/мг протеина
pCIB4421	9000 ± 800 нг Vt/мг протеина

Эксперимент 2 (10-дневные сеянцы):

pCIB4419	5000 ± 270 нг Vt/мг протеина
pCIB4420	80 ± 14 нг Vt/мг протеина
pCIB4421	1600 ± 220 нг Vt/мг протеина

Эксперимент 3 (11-дневные сеянцы):

pCIB4419	21500 ± 1800 нг Vt/мг протеина
pCIB4420	260 ± 50 нг Vt/мг протеина
pCIB4421	11900 ± 4000 нг Vt/мг протеина
pCIB4423	7200 ± 3400 нг Vt/мг протеина

Вышеуказанные эксперименты подтверждают, что оба CaMV 35S и PERC промоторы экспрессируют синтетический Vt CryIA(b) протеин на очень высоких

уровнях. Сердцевинный промотор, хотя и менее эффективный, также эффективен для экспрессии синтетического cryIA(b) протеина.

Пример 44: Стабильная экспрессия синтетического Bt в салате

Синтетический Bt ген в векторе pCIB4417 *Agrobacterium* трансформируют в *Lactuca sativa* cv. сорта Redprize (салат). Используют процедуру трансформации, описанную Enomoto et al., *Plant Cell Reports*, 9: 6-9 (1990).

Процедура трансформации:

Семена салата стерилизуют на поверхности в 5% Хлороксе в течение 5 минут, затем несколько раз промывают в стерильной дистиллированной воде. Стерилизованные поверхностно семена помещают на среду MS (с половинной эффективностью (Murashige и Skoog, *Physiol. Plant*, 15: 473-497 (1962))). Семядоли шестидневных сеянцев Redprize, выращивающихся при освещенности 3000 л × 16 часов при 25° С, используют в качестве эксплантатов для инфицирования *Agrobacterium*. Основание и макушку каждой семядоли удаляют скальпелем. Эксплантаты погружают на 10 минут в бактериальный раствор, который перед этим культивировали в течение 48 часов в АВ минимальной среде с соответствующими антибиотиками при 28° С. После удаления избытка бактериальной среды стерильной фильтровальной бумагой, эксплантаты помещают на MS среду (0,1 мг/л BA и 0,1 мг/л NAA) на 2 дня. Затем эксплантаты переносят на селективную среду, содержащую 500 мг/л карбенициллина и 50 мг/л канамицина. Эксплантаты субкультивируют на свежей среде еженедельно. Условия в растительной камере: 16 часов 2000 л × свет при 25° С. Спустя приблизительно 4 недели, проводят ELISA для выглядящих здоровыми каллюсов из каждой из четырех пластин, которые были культивированы. Процедура ELISA та же, что была описана ранее для протопластов; растворимый протеин снова определяют в Biorad анализе, как указано ранее.

Полученные результаты:

pCIB3021 (кан. контроль)	0
pCIB4417 (пластина 1)	0
pCIB4417 (пластина 2)	505 нг Bt/мг протеина
pCIB4417 (пластина 3)	45 нг Bt/мг протеина

pCIB4417 (пластина 4) 1200 нг Bt/мг протеина

Этот пример демонстрирует, что двудольные растения также могут демонстрировать повышенную экспрессию оптимизированного инсектицидного гена.

Пример 45: Конструирование pCIB4429

pCIB4429 содержит предпочтительный для кукурузы специфический для пыльцы промотор, слитый с оптимизированным для кукурузы *cryIA(b)* геном. Специфический для пыльцы кукурузы промотор, используемый в этой конструкции, получают из плазмиды pKL2, описанной в примере 37. Оптимизированный для кукурузы *cryIA(b)* ген получают из плазмиды pCIB4418, и он также описан в примере 37.

pKL2 является плазмидой, которая содержит предпочтительный для кукурузы специфический для пыльцы промотор, слитый с геном бета-глюкуронидазы *E.coli* геном. Его конструируют из плазмид pSK110 и pCIB3054. pSK110 содержит специфический для пыльцы кукурузный промотор. pCIB3054, производное pUC19, содержит ген бета-глюкуронидазы (GUS) *E.coli*, слитый с промотором вируса мозаики цветной капусты (CaMV/35S). Его конструирование описано в этой заявке. Этот промотор можно удалить из плазмиды, обрабатывая Sall/HindIII до получения фрагмента, содержащего GUS ген, ген бактериальной устойчивости к ампициллину и ColEI источник репликации. Второй фрагмент содержит CaMV 35S промотор.

pCIB3054 обрабатывают рестриктазой Sall и HindIII, используя стандартные условия в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь экстрагируют смесью фенол/хлороформа, используя стандартные условия, и ДНК выделяют, осаждая этанолом в стандартных условиях. Выделенную ДНК повторно суспендируют в буфере, соответствующем реакции, со щелочной фосфатазой кишечника телят (CIP), и подвергают взаимодействию с 2,5 единицами CIP при 37°С в течение ночи. После CIP реакции, ДНК очищают на агарозном геле, используя стандартные условия, описанные всюду в заявке. pSK110 обрабатывают Sall/HindIII в стандартных условиях в течение 2 часов при комнатной температуре, и ДНК затем очищают на агарозном геле, используя стандартные условия. Выделенные ДНК фрагменты

лигируют, используя стандартные условия, в течение 2 часов при комнатной температуре, и затем трансформируют компетентные клетки штамма *E.coli* HB101 клетки, используя стандартные условия. Полученные трансформанты отбирают на L-агаре, содержащем 100 мкг ампициллина/мл. Трансформанты изучают на наличие целевой плазмидной конструкции, используя стандартную процедуру минискринирования плазмид. Нужную конструкцию обозначают pKL2.

Для получения pCIB4429, осуществляют трехстадийное лигирование, используя известные специалистам условия. Три лигированных фрагмента представляют собой:

1) HindIII/BamHI фрагмент из pCIB4418, длиной около 4,7 т.п.о., содержащий *cryIA(b)* ген, ген бактериальной устойчивости к ампициллину, и ColEI источник репликации.

2) HindIII/XbaI фрагмент из pKL2 длиной около 1,3 т.п.о. длиной, содержащий специфический для пыльцы промотор из кукурузы.

3) PCRC полученный фрагмент, полученный из пыльцевого промотора, с BamHI сайтом, находящимся за сайтом начала транскрипции. Этот фрагмент представляет собой фрагмент длиной приблизительно 120 п.о. XbaI/BamHI.

PCR фрагмент получают, используя 100 мкл реакционный объем и описанные ранее стандартные условия. Используют праймеры:

SK50: 5'-CCC TTC AAA ATC TAG AAA CCT-3'

KE127: 5'-GCG GAT CCG GCT GCG GCG GGG AAC GA-3'

Вышеуказанные праймеры смешивают в PCR реакционной среде с плазмидой pSK105, плазмидой, которая содержит специфический для пыльцы промотор из кукурузы.

После завершения PCR реакции, 10 мкг реакционной среды обрабатывают на агарозном геле, используя стандартные условия, для того, чтобы убедиться, что в реакции продуцируется продукт ожидаемого размера. Оставшиеся 90 мкл обрабатывают протеиназой K в окончательной концентрации 50 мкг/мл в течение 30 минут при 37°C. Затем реакционную смесь нагревают при 65°C в течение 10 минут, экстрагируют смесью фенол/хлороформ, используя стандартные процедуры. ДНК выделяют из надосадочной жидкости, осаждая

двумя объемами этанола в стандартных условиях. После осаждения ДНК выделяют центрифугированием в микроцентрифуге. Полученный осадок промывают 1 раз 70% этанолом (стандартная процедура), быстро сушат для удаления этанола, и осадок вновь суспендируют в 17 мкл ТЕ буфера. 2 мкл 10X рестрикционного буфера добавляют, также как и 0,5 мкл BamHI и 0,5 мкл XbaI. ДНК обрабатывают в течение 1 часа при 37°C до получения XbaI/BamHI фрагмента. После обработки рестриктазами, этот фрагмент очищают на агарозном геле, содержащем 2% NuSieve (FMC)/1% агарозного геля. Фильтры Millipore используют для элюирования ДНК из агарозы, используя указания изготовителей. После элюирования ДНК используют в описанном ранее трехстадийном лигировании.

После лигирования, ДНК трансформируют компетентные клетки *E.coli* HB101, используя стандартные способы. Трансформанты отбирают на L-агарных пластинах, содержащих ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Колонии, которые растут в селективных условиях, изучают на наличие плазмидных вставок, используя стандартные методики.

Пример 46: Конструирование pCIB4431, вектора для ткане-специфической экспрессии синтетического cryIA(b) гена в растениях

pCIB4431 является вектором, сконструированным для трансформации кукурузы. Он содержит два химерных Vt эндотоксиновых гена, экспрессируемых в кукурузу. Эти гены представляют собой промотор PEP карбоксилазы, синтетический cryIA(b), специфический для пыльцы промотор/синтетический-cryIA(b). Слияние PEP карбоксилазы/cryIA(b) ген в этом векторе получают из pCIB4421, описанной ранее. Промотор пыльцы также описан ранее. Фиг.20 представляет карту плазмиды pCIB4431. pCIB4432 конструируют в результате лигирования трех частей, используя около Kpn I/Hind III фрагмент (содержащий пыльца/синтетический-cryIA(b) pCIB4429 размером 3,5 т.п.о., Hind III/EcoRI (PEP/синтетический cryIA(b)) размером 4,5 т.п.о. и около Kpn I/EcoRI фрагмент векторного Bluescript размером 2,6 т.п.о.

Другими векторами, содержащие промотор пыльцы/синтетический CryIA(-b) химерный ген, являются pCIB4428 и pCIB4430. См. фиг.21 и 22. pCIB4430 содержит также PEP/синтетический-Vt ген, описанный ранее.

Пример 47: Продуцирование трансгенных растений кукурузы, содержащих синтетический оптимизированный для кукурузы CryIA(b) ген

В примере далее используют Biolistics для введения ДНК в клетки кукурузы, из которых создают трансформированные растения.

Эксперимент КС-65

Продуцирование трансгенных растений кукурузы, экспрессирующих синтетический cryIA(b) ген, с использованием ткане-специфического промотора.

Ткани

Незрелые эмбрионы кукурузы, приблизительно 1,5-2,5 мм длиной иссекают из початка генотипа 6N615 в возрасте 14-15 дней после опыления. Материнское растение выращивают в теплице. Перед иссечением початок стерилизуют 20% Хлороксом в течение 20 минут, и промывают 3 раза стерильной водой.

Отдельные эмбрионы помещают щитком в 2 см квадратные участки по 36 эмбрионов на пластине, на иницирующей образование каллуса среде, 2DG4 + 5 хлорамбен среде (N6 основные соли, B5 добавочные соли, MS железо, 2% сахарозы, с 5 мг/л хлорамбена, 20 мг/л глюкозы) и 10 мл G4 добавок добавляют после обработки в автоклаве.

G4 добавки

Ингредиент	на литр среды
Казеингидролизат	0,5 г
Пролин	1,38 г
Никотиновая кислота	0,2 мг
Пиридоксин-HCl	0,2 мг
Тиамин-HCl	0,5 мг
Холин-HCl	0,1 мг
Рибофлавин	0,05 мг
Биотин	0,1 мг
Фолиевая кислота	0,05 мг
Пантотенат кальция	0,1 мг
Пара-аминобензойная кислота	0,05 мг

Ингредиент	на литр среды
B12	0,136 мкг

Бомбардировка

Ткани бомбардируют, используя PDS-1000He Biolistics устройство. Ткани помещают на полку на 8 см ниже стопорного экрана. Ткани обстреливают один раз раствором ДНК/микроноситель-золото, 10 мкг, высушенного на макроносителе. Используют стопорный экран, в котором проделаны отверстия, у ABRU с использованием 10×10 сетчатого экрана из нержавеющей стали. Используют диски разрушения 1550 psi. После бомбардировки эмбрионы культивируют в темноте при 25°С.

Получение ДНК для поставки

Микроноситель приготавливают в соответствии с инструкциями поставщика устройства Biolistics. При вращении 50 мкл 1,0 мк золотого микроносителя добавляют 5 мкг pCIB4431 (1,23 мкг/мкл) (#898) + 2 мкл pCIB3064 0,895 мкг/мкл (#456), затем 50 мкл 2,5 М CaCl₂, затем 20 мкл 0,1 М спермидина (свободное основание ТС степени чистоты). Полученную смесь вращают 3 минуты и обрабатывают в микроцентрифуге в течение 10 секунд. Надосадочную жидкость удаляют, и микроносители промывают 2 раза 250 мкл 100% EtOH (ВЖЭХ степени чистоты) коротко вращая, центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Микроносители повторно суспендируют в 65 мкл 100% EtOH.

Образование каллюса

Эмбрионы переносят в среду, инициирующую образование каллюса с 3 мг/л PPT через день после бомбардировки. Эмбрионы оценивают по инициированию каллюсообразования спустя 2 и 3 недели после бомбардировки. Все среагировавшие переносят на среду, поддерживающую каллюс, 2DG4 + 0,5 2,4-D среды с 3 мг/л PPT. Поддерживающая каллюс среда: N6 основные соли, B5 примесные соли, MS железо, 2% сахароза, с 0,5 мг/л 2,4-D, 20 мг/л глюкозы и 10 мл G4 дополнительно добавляемых после обработки в автоклаве. Эмбриогенный каллюс субкультивируют каждые 2 недели для поддержания

свежей среды, содержащей 3 мг/л PPT. Все каллюсы инкубируют в темноте при 25° С.

Реакция образования каллюса типа I составляет 15%. Каждый из эмбрионов, который продуцирует каллюс, культивируют отдельно, что дает начало индивидуальной линии.

Регенерация

Спустя 12 недель селекции ткани извлекают из поддерживающей каллюс среды с PPT и помещают в среду для регенерации. Среда для регенерации представляет собой 0,25MS3S5BA (0,25 мг/л 2,4-D, 5 мг/л BAP, MS соли, 3% сахарозы) в течение 2 недель с последующим субкультивированием в MS3S среде для регенерации растений. Спустя 4-10 недель растения извлекают и помещают в GA 7. Наша линия KC65 0-6, которая становится #176 BT, продуцирует всего 38 растений.

Анализ

Все растения по мере того, как они стабилизируются в GA7, тестируют хлорфенолом красным (CR) на устойчивость к PPT по способу патентной заявки США 07/759243, поданной 13 сентября 1991 года, соответствующие части которой включены сюда по ссылке. В этом анализе используют рН чувствительный индикаторный краситель для того, чтобы показать, какие клетки растут в присутствии PPT. Клетки, которые выращивают, продуцируют изменение рН среды и превращают индикатор в желтый (из красного). Растения, экспрессирующие ген устойчивости к PPT легко обнаруживается в этом тесте. (#176 = 8 позитивных/30 негативных). Растения, позитивные в CR тесте анализируют в PCR на присутствие синтетического BT гена. (#176 = 5 позитивных/2 негативных/1 погибший).

Растения, позитивные в PCR для sup-BT гена отправляют в фитотрон. После установления в фитотроне их изучают, используя биоанализ насекомых и анализ ELISA. Растения биоанализируют, используя стандартный анализ на мотылька кукурузного (ECB) (описано в примере 5A), в котором небольшие кусочки листьев, отщипнутые от растения и помещенные в небольшие чашки петри, дополняют рядом новорожденных личинок ECB. Растения обычно анализируют при достижении высоты около 15 см. Те растения, которые дают

100% гибели ЕСВ в этом анализе, характеризуют далее. Данные ELISA представлены далее. Позитивные растения переносят в теплицу.

Теплица/фертильность

Растение #176-11 опыляют пыльцой дикого типа 6N615. Получают одну метелку початка и зародыш початка. Все эмбрионы из метелки (11) и 56 зерен из початка 1 были спасены. 294 зерна, оставшиеся на початке, высохли естественным образом.

Пыльцу от #176-11 скрестили с различными генотипами кукурузы 5N984, 5NA89 и 3N961. Эмбрионы были извлечены из всех трех ауткроссов (5N984 = 45; 5NF89 = 30; 3N961 = 8).

Большинство зерен, оставшихся на початках в теплице, высохли естественным путем.

Выделяют ДНК из растения #176-11, используя стандартные методики и проводя саузерн-блоттинг. Было обнаружено, что она содержит последовательности, которые гибридизуются с зондами, созданными из синтетического *scuIA(b)* гена, и с зондом, полученным из *PAT* гена. Эти результаты показывают, что произошла интеграция этих генов в геном кукурузы.

Эксперимент КС-64

Продуцирование трансгенных растений кукурузы, которые экспрессируют синтетический *scuIA(b)* ген, используя конститутивный промотор.

Ткани

Незрелые эмбрионы кукурузы, длиной приблизительно 1,5-2,5 мм, иссекают из початка генотипа 6N615 возраста 14-15 дней после опыления. Материнское растение выращивают в теплице. Перед иссечением поверхность початка стерилизуют 20% Хлороксом в течение 20 минут и трижды промывают стерильной водой. Отдельные эмбрионы помещают щитком в 2 см² участки, по 36 эмбрионов на пластину, на иницирующую образование каллюса среду, 2DG4 + 5 хлорамбеновую среду (N6 основные соли, B5 примесные соли, MS железо, 2% сахарозы, с 5 мг/л хлорамбена, 20 мг/л глюкозы) и 10 мл G4 дополнений добавляют после обработки в автоклаве.

G4 добавки

Ингредиент	на литр среды
------------	---------------

Казеингидролизат	0,5 г
Пролин	1,38 г
Никотиновая кислота	0,2 мг
Пиридоксин-НСl	0,2 мг
Тиамин-НСl	0,5 мг
Холин-НСl	0,1 мг
Рибофлавин	0,05 мг
Биотин	0,1 мг
Фолиевая кислота	0,05 мг
Пантотенат кальция	0,1 мг
Пара-аминобензойная кислота	0,05 мг
В12	0,136 мкг

Бомбардировка

Ткани бомбардируют, используя PDS-1000He Biolistics устройство. Ткани помещают на полку на 8 см ниже стопорного экрана. Ткань обстреливают один раз раствором ДНК/золотой микроноситель, 10 мкл, высушенные в макроносителе. Стопорный экран, который используют, был пробит ABRU с использованием 10×10 сетчатого экрана из нержавеющей стали. Разрушенные диски 1550 psi были использованы. После бомбардировки эмбрионы культивируют в темноте при 25°С.

Приготовление ДНК для поставки

Микроноситель готовят в соответствии с инструкциями поставщика Biolistics устройства. При вращении 50 мкл 1,0 мк золотого микроносителя добавляют 3,2 мкл pCIB4418 (0,85 мкг/мл) (#905) + 2 мкл pCIB3064 0,895 мкг/мкл (#456) + 1,6 мкл pCIB3007A (1,7 мкг/мкл) (#152), а затем 50 мкл 2,5 М CaCl₂, затем 20 мкл 0,1 М спермидина (свободное основание, ТС степени чистоты). Полученную смесь вращают в течение 3 минут и микроцентрифугируют в течение 10 секунд. Надосадочную жидкость удаляют, и микроносители дважды промывают 250 мкл 100% EtOH (ВЖЭХ степени чистоты), коротко вращая, центрифугируя и удаляя надосадочную жидкость. Полученный микроноситель повторно суспендируют в 65 мкл 100% EtOH.

Образование каллюса

Эмбрионы переносят на среду, инициирующую образование каллюса, с 3 мг/л PPT спустя день после бомбардировки. Эмбрионы оценивают по инициированию образования каллюса спустя 2 и 3 недели после бомбардировки. Все прореагировавшие образцы переносят на поддерживающую каллюс среду, 2DG4 + 0,5 2,4-D среду с 3 мг/л PPT. Среда, поддерживающая каллюс, состоит из N6 основных солей, B5 дополнительных солей, MS железа, 2% сахарозы, с 0,5 мг/л 2,4-D, 20 мг/л глюкозы) и 10 мл G4 добавок, вводимых после обработки на автоклаве. Эмбриогенный каллюс субкультивируют каждые 2 недели для поддержания свежей среды, содержащей 3 мг/л PPT. Все каллюсы инкубируют в темноте при 25°С.

Реакция образования каллюса типа I составляет 18%. Каждый эмбрион, который образовывал каллюс, культивируют как отдельный тип, и в результате получают отдельную линию.

Регенерация

Спустя 12 недель селекции ткани удаляют из поддерживающей каллюс среды с PPT и помещают на регенерационную среду и инкубируют при 25°С, используя 16 часов света (50 мкЕ .м-2. s-1) (8 часов темного фотопериода). В качестве регенерационной среды используют 0,25MS3S5BA (0,25 мг/л 2,4-D, 5 мг/л BAP, MS соли, 3% сахарзы) в течение 2 недель с последующим субкультивированием до MS3S среды для регенерации растений. Спустя 4-10 недель растения удаляют и помещают в GA 7. Наша линия KC64 0-1, которая стала #170 BT, продуцирует 55 растений. Наша линия KC64 0-7, которая стала #171 BT, продуцирует всего 33 растения.

Анализ

11 растений, после их стабилизации в GA7, тестируют хлорфенолом красным (CR) на устойчивость к PPT по способу Shillito et al., как указано ранее. В этом анализе используют pH чувствительный индикаторный краситель для того, чтобы выяснить, какие клетки растут в присутствии PPT. Клетки, которые растут, продуцируют изменение pH в среде, в результате чего индикатор становится желтым (из красного). Растения, экспрессирующие ген устойчивости к PPT, легко различить в этом тесте. Растения, позитивные в CR

тесте, используют в анализе PCR на наличие синтетического ВТ гена. (образцы 170 = 37 позитивных/18 негативных; #171 = 25 позитивных/8 негативных).

Растения, позитивные по данным PCR для суп-ВТ гена, отправляют в фитотрон. После стабилизации в фитотроне их характеризуют, используя биоанализы по насекомым и ELISA. Проводят биоанализ растений, используя обычных мотыльков кукурузных (см. далее), где небольшие кусочки листьев отщипывают с растения и помещают в небольшие чашки петри с некоторым количеством ЕСВ новорожденных личинок. Растения обычно анализируют, когда они достигают высоты около 15 см. Те растения, которые дают 100% гибели ЕСВ в этом анализе, характеризуют далее. ELISA данные представлены далее. Позитивные растения переносят в теплицу.

Basta скринирование

8 зрелых растений из #170 отбирают для оценки Basta (Hoechst) устойчивости. На один средний лист для каждого растения на участок приблизительно 10-14 см длину × ширину листа наносят 0, 0,4, 1,0 или 2,0% (10 мл 200 г/л разбавленной до 100 мл деионизированной водой) водной Basta, содержащей 2 капли Tween 20/100 мл. Два растения тестируют для каждого уровня. В качестве контроля используют 8 дикого типа 6N615 растений примерно того же возраста. Все растения наблюдают на 4 и 7 день. Все контрольные растения гибнут. Во время этого исследования оказалось, что ни одно из #170 растений не было повреждено гербицидом.

Опыление

Все метелки, первый початок и при возможности второй початок на растениях #170 и #171 были опылены дикого типа 6N615 пыльцой. По крайней мере 90% растений оказались фертильными по женской линии.

Пальцой с #171 произвели ауткросс с генотипами 6M615, 5N984, 5NA89, 6F010, 5NA56, 2N217AF, 2NDO1 и 3N961. По крайней мере, 90% растений оказались фертильны по пыльце.

Выделение эмбрионов

Эмбрионы из #171 были "извлечены". Спустя 14-16 дней после оплодотворения, кончик початка с 25-50 зернами срезают с початка. Перед срезкой кукурузную обертку осторожно отодвигают, обнажая верхнюю часть

початка. Срезанный конец початка на растении окрашивают фунгицидом Каптан, и обертку возвращают на место. Оставшимся в початке зернам дают возможность высохнуть естественным способом.

Выделенный кусочек початка стерилизуют 20% хлороксом в течение 20 минут, и промывают трижды стерильной водой. Отдельные эмбрионы выделяют помещают щитком вверх на B5 среду (Gamborg), содержащую 2% сахарозы. После автоклавирования к среде добавляют витамин B5. 4 эмбриона помещают в GA7 контейнеры, и их инкубируют в темноте. Если происходит прорастание, контейнеры перемещают в светлую комнату и инкубируют при 25°С, используя световой режим 16 часов свет/8 часов темнота. Процент прорастания составил 94%.

Потомство от 15 растений #171 и 2 #176 извлекают, используя стандартные эмбрионы и оценивают. Все растения оценивают в анализе на насекомых. Растения из #171 также тестируют в гистохимическом GUS анализе. В обоих анализах на насекомых и GUS анализе, отношение сегрегации трансгенов составило 1:1, как ожидалось для отдельной локусной вставки.

Пример 48: Анализ трансгенных растений кукурузы

ELISA анализ

Экспрессию гена *cryIA(b)* в трансгенной кукурузе контролируют, используя биоанализ насекомого мотылька кукурузного, и ELISA анализ для количественного уровня получаемого *cryIA(b)* протеина.

Количественное определение *cryIA(b)* IP в листьях трансгенных растений осуществляют, используя иммуно-ферментный анализ (ELISA) по способу Clark M.F., Lister R.M., Bar-Joseph M: ELISA Techniques. B: Weissbach A., Weissbach H. (eds.) Methods in Enzymology 118: 742-766, Academic Press, Florida (1986). Иммуноафинно очищенные поликлональные антитела кролика и козла, специфичные для *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* IP используют для определения нг IP на мг растворимого протеина из неочищенных экстрактов образцов листьев. Чувствительность двойного сэндвич ELISA составляет 1-5 нг/IP на мл растворимого протеина, с использованием 50 мкг полного протеина на микротитровальную ячейку ELISA.

Кукурузные экстракты готовят, измельчая ткани листьев в выложенных марлей пластиковых пакетах, используя ручной шаровой гомогенизатор (AGDJA, Elkart IN) в присутствии экстракционного буфера (50 мМ Na₂CO₃, pH 9,5, 100 мМ NaCl, 0,05% тритон, 0,05% Tween, 1 мМ PMSF и 1 мкМ леупептина). Определение протеина осуществляют, используя Bio-Rad (Richmond, CA) протеиновый анализ.

В вышеописанных процедурах были проанализированы первичные кукурузные трансформанты, описанные ранее, на присутствие *sguIA(b)* протеина с использованием ELISA. Эти растения были различны по высоте: от 15 см до около 120 см ко времени анализа.

Растение	Вт нг/мг растворимый протеин	5/27/91
176-8	0	0
176-10	700	1585
176-11	760	2195
171-4A	59	
171-6	50	
171-8	60	
171-9	280	
171-13	77	
171-14A	43	
171-14B	60	
171-15	55	
171-16A	13	
171-16B	19	
171-18	19	
176-30	1160	
171-32	980	
171-31	166	
171-30	370	
71-14		

Растение	Bt нг/мг растворимый протеин	5/27/91
#10 лист	26	
1 лист	17	
Растение 171-16		
#9 лист	40	
#1 лист	120	

Анализ на мотылька кукурузного

1. Кусочки 1-4 см отрезают от длинного листа растения кукурузы.
2. Каждый кусочек листа помещают на увлажненный диск фильтровальной бумаги в 50×9 см чашки петри.
3. 5 новорожденных личинок мотылька кукурузного помещают на каждый кусочек листа. (Это составляет всего 5-20 личинок на каждое растение).
4. Чашки петри инкубируют при 29,5°С.
5. Повреждения кормового листа и данные о гибели личинок оценивают через 24, 48 и 72 часа.

Пример 49: Экспрессия Bt эндотоксина в потомстве трансформированных растений кукурузы

Трансформированные растения кукурузы оказались полностью фертильны и были скрещены с несколькими генотипами кукурузы. Потомство от этих скрещиваний анализируют на их способность убивать мотылька кукурузного (ЕСВ) в стандартном ЕСВ биоанализе (как описано ранее), а также на присутствие *cryIA(b)* протеина с использованием ELISA, как указано ранее. Способность убивать ЕСВ и продуцировать *cryIA(b)* протеин коррелируют друг с другом. Эти эксперименты разделяют потомство в отношении 1:1, что указывает на один сайт включения для активной копии синтетического гена. Это отношение 1:1 справедливо как для конститутивный промотор/синтетический-*cryIA(b)* растений, так и для ткане-специфический промотор/синтетический-*cryIA(b)* растений (данные не представлены).

Фиг.23А представляет собой таблицу с небольшим набором из полного числа проанализированного потомства. В этой таблице представлен ряд различных скрещиваний.

Анализ на насекомых проводят с *Diatrea saccharalis* и *Ostrinia nubilalis* с использованием листового материала (как указано ранее) трансгенного потомства, содержащего оптимизированный для кукурузы CryIA(b) ген. Результаты этого анализа представлены на фиг.23В. Они показывают, что оптимизированный для кукурузы CryIA(b) ген функционирует в трансформированной кукурузе, обеспечивая устойчивость к огневке сахарного тростника и *Ostrinia nubilalis*.

Пример 50: Экспрессия CryIA(b) гена в пыльцу кукурузы

Потомство трансформированных растений кукурузы, содержащих химический промотор пыльцы/синтетический cryIA(b) ген, полученный из pCIB4431, выращивают в поле до зрелости. Собирают пыльцу и анализируют на присутствие cryIA(b) протеина, используя стандартные методики ELISA, как указано всюду. В пыльце были определены высокие уровни содержания cryIA(b) протеина. Потомство 35S промотор/синтетический cryIA(b) трансформированных растений выращивают в теплице. Пыльцу от этих растений исследуют, используя ELISA, и определяют cryIA(b) протеин. Полученные результаты представлены на фиг.23С.

Было обнаружено, что на экспрессию могут также оказывать влияние такие факторы, как линии селекции растений, генотипы растений, синтетические последовательности и т.п.

Пример 51: Экспрессия CryIA(b) гена, слитого с сердцевинно-предпочтительным промотором, выделенным из кукурузы

pCIB4433 (фиг. 36) содержит плазмиду, включающую оптимизированный для кукурузы CryIA (b)-ген слитый с предпочтительным для сердцевины промотором, выделенным из кукурузы.

Эту плазмиду конструируют, используя трехстадийное лигирование, состоящее из:

- 1) pCIB4418 обрабатывают BstEII и BamHI; фрагмент размером 1,8 т.п.о.

2) pBTin1 обрабатывают NsiI и BstEI; фрагмент размером 5,9 т.п.о.; pBTin1 описан во всей заявке.

3) PCR фрагмент VI-151 создают в PCR реакции, используя стандартные условия, как описано во всей заявке.

Использованные PCR праймеры:

KE150A28: 5' - ATT CGC ATG CAT GTT TCA TTA TC-3'

KE151A28: 5' - GCT GGT ACC ACG GAT CCG TCG CTT CTG TGC AAC AAC C-3'

После PCR реакции ДНК проверяют на агарозном геле для того, чтобы убедиться, что реакция прошла правильно. ДНК выделяют из PCR реакционной среды, используя стандартные условия, описанные в заявке, и последовательно обрабатывают рестриктазами NsiI и BamHI, используя стандартные условия. После разрезания фрагмент ведут на 2% NuSieve геле, и нижнюю полосу выделяют, как указано ранее. ДНК используют для лигирования, как указано ранее.

После лигирования (в стандартных условиях) ДНК трансформируют компетентные клетки E.coli.

Трансформацию ведут, используя микробомбардировку в соответствии с указанным ранее. Эмбрионы переносят в среду, содержащую 100 мкг/мл PPT через 24 часа после микробомбардировки. Полученный каллус переносят в среду, содержащую 40 мкг/мл PPT спустя 4 недели. растения регенерируют без селекции.

Небольшие образцы растений (3-5) анализируют в PCR для каждой из линий. Для указания различных положений и расстояний эмбрионов по отношению к устройству для микробомбардировки, добавляют дополнительные кодовые обозначения. Растения отправляют в теплицу, присваивая им следующие обозначения:

JS21A TOP	Растения <u>B.t.</u> PCR позитивны
JS21A MID	Растения <u>B.t.</u> PCR позитивны
JS21C BOT	Растения <u>B.t.</u> PCR позитивны
JS22D MID	Растения <u>B.t.</u> PCR позитивны
JS23B MID	Растения <u>B.t.</u> PCR негативны (для контроля)

Образцы листьев от регенерированных растений биоанализируют на инсектицидную активность против мотылька кукурузного, как указано в примере 48, а полученные результаты представлены на фиг.23D.

ELISA анализ образцов листьев для определения уровня экспрессии CryIA(b) протеина в листьях проводят по способу примера 48, а полученные результаты представлены на фиг.23E.

Депозиты

Нижеследующие плазмиды были депонированы в Коллекции культур сельскохозяйственного исследовательского института (NRRL) (1818 N. University St., Peoria, IL 61604) в соответствии с Будапештским соглашением: pCIB4418, pCIB4420, pCIB4429, pCIB4431, pCIB4433, pCIB5601, pCIB3166 и pCIB3171.

Настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные его воплощения; однако, следует учитывать, что возможны различные варианты, модификации и воплощения. Соответственно, все эти варианты, модификации и воплощения следует рассматривать как входящие в объем изобретения.

RU 2202611 C2

RU 2202611 C2

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(2) ИНФОРМАЦИЯ для последовательности ID №1

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 4 360 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) тип нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: ДНК

(iii) гипотетическая: нет

(iv) антисмысловая: нет

(vi) источник:

(A) организм: *Bacillus thuringiensis*

(B) штамм: Kurstaki HD-1

(C) отдельный изолят: Cgy1A/b/ инсектицидный кристаллический протеиновый ген

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID №1

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

RU 2202611 C2

GTTAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAAATTA	GTTGCACTTT	GTGCATTTTT	60
TCATAAGATG	AGTCATATGT	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG	120
AATTGGTATC	TTAATAAAAG	AGATGGAGGT	AACTTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG	180
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TTAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGAGAAAGAA	240
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGATATTT	CCTTGTCGCT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG	300
AATTTGTTCC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GACTIONTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG	360
GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTTGTTAC	AAATTGAACA	GTTAATTAAC	CAAAGAATAG	420
AAGAATTCGC	TAGGAACCAA	GCCATTTCTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA	480
TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG	540
AGATGCGTAT	TCAATTCAAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG	600
CAGTTCAAAA	TTATCAAGTT	CCTCTTTTAT	CAGTATATGT	TCAAGCTGCA	AATTTACATT	660
TATCAGTTTT	GAGAGATGTT	TCAGTGTTTG	GACAAAGGTG	GGGATTTGAT	GCCGCGACTA	720
TCAATAGTCG	TTATAATGAT	TTAACTAGGC	TTATTGGCAA	CTATACAGAT	CATGCTGTAC	780
GCTGGTACAA	TACGGGATTA	GAGCGTGTAT	GGGGACCGGA	TTCTAGAGAT	TGGATAAGAT	840
ATAATCAATT	TAGAAGAGAA	TTAACACTAA	CTGTATTAGA	TATCGTTTCT	CTATTTCCGA	900
ACTATGATAG	TAGAACGTAT	CCAATTCGAA	CAGTTTCCCA	ATTAACAAGA	GAAATTTATA	960
CAAACCCAGT	ATTAGAAAAT	TTTGATGGTA	GTTTTTCGAGG	CTCGGCTCAG	GGCATAGAAG	1020
GAAGTATTAG	GAGTCCACAT	TTGATGGATA	TACTTAACAG	TATAACCATC	TATACGGATG	1080
CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT	1140

RU 2202611 C2

CGGGGCCAGA ATTCAC TTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC	1200
GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT TTATATAGAA	1260
GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT TCTTGACGGG ACAGAATTTG	1320
CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT	1380
CGCTGGATGA AATACCGCCA CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC	1440
GATTAAGCCA TGTTTCAATG TTTCGTTTCA GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA	1500
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA ATTCCTTCAT	1560
CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT TGGCTCTGGA ACTTCTGTGG	1620
TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT	1680
CAACCTTAAG AGTAAATATT ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT	1740
A CGCTTCTAC CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG	1800
GGAATTTTTTC AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC TTTAGGACTG	1860
TAGGTTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG TGTATTTACG TTAAGTGCTC	1920
ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG	1980
TAACCTTTGA GGCAGAATAT GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA	2040
CTTCTTTCAA TCAATCGGG TTAACAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT	2100
CCAATTTAGT TGAGTGTTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAA GAATTGTCCG	2160
AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA TTTACTTCAA GATCCAAACT	2220
TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC	2280
A AGGAGGCGA TGACGTATTC AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT	2340
GCTATCCAAC GTATTTATAT CAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT	2400
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA ATTCGCTACA	2460
ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC CTTATGGCCG CTTTCAGCCC	2520
CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG	2580
GATGTACAGA CTTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG	2640
ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG	2700
CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT	2760

GGGAAACAAA	TATTGTTTAT	AAAGAGGCAA	AAGAATCTGT	AGATGCTTTA	TTTGTAACCT	2820
CTCAATATGA	TAGATTACAA	GCGGATACCA	ACATCGCGAT	GATTCATGCG	GCAGATAAAC	2880
GCGTTCATAG	CATTTCGAGAA	GCTTATCTGC	CTGAGCTGTC	TGTGATTCCG	GGTGTCAATG	2940
CGGCTATTTT	TGAAGAATTA	GAAGGGCGTA	TTTTCACCTG	ATTCTCCCTA	TATGATGCGA	3000
GAAATGTCAT	TAAAAATGGT	GATTTTAATA	ATGGCTTATC	CTGCTGGAAC	GTGAAAGGGC	3060
ATGTAGATGT	AGAAGAACAA	AACAACCACC	GTTCCGGTCCT	TGTTGTTCCG	GAATGGGAAG	3120
CAGAAGTGTC	ACAAGAAGTT	CGTGTCTGTC	CGGGTCGTGG	CTATATCCTT	CGTGTCACAG	3180
CGTACAAGGA	GGGATATGGA	GAAGGTTGCG	TAACCATTCA	TGAGATCGAG	AACAATACAG	3240
ACGAACTGAA	GTTTAGCAAC	TGTGTAGAAG	AGGAAGTATA	TCCAAACAAC	ACGGTAACGT	3300
GTAATGATTA	TACTGCGACT	CAAGAAGAAT	ATGAGGGTAC	GTACACTTCT	CGTAATCGAG	3360
GATATGACGG	AGCCTATGAA	AGCAATTCTT	CTGTACCAGC	TGATTATGCA	TCAGCCTATG	3420
AAGAAAAAGC	ATATACAGAT	GGACGAAGAG	ACAATCCTTG	TGAATCTAAC	AGAGGATATG	3480
GGGATTACAC	ACCACTACCA	GCTGGCTATG	TGACAAAAGA	ATTAGAGTAC	TTCCCAGAAA	3540
CCGATAAGGT	ATGGATTGAG	ATCGGAGAAA	CGGAAGGAAC	ATTCATCGTG	GACAGCGTGG	3600
AATTACTTCT	TATGGAGGAA	TAATATATGC	TTTATAATGT	AAGGTGTGCA	AATAAAGAAT	3660
GATTACTGAC	TTGTATTGAC	AGATAAATAA	GGAAATTTTT	ATATGAATAA	AAAACGGGCA	3720
TCACTCTTAA	AAGAATGATG	TCCGTTTTTT	GTATGATTTA	ACGAGTGATA	TTTAAATGTT	3780
TTTTTTGCGA	AGGCTTTACT	TAACGGGGTA	CCGCCACATG	CCCATCAACT	TAAGAATTTG	3840
CACTACCCCC	AAGTGTCAAA	AAACGTTATT	CTTCTAAAAA	AGCTAGCTAG	AAAGGATGAC	3900
ATTTTTTATG	AATCTTTCAA	TTCAAGATGA	ATTACAACCTA	TTTTCTGAAG	AGCTGTATCG	3960
TCATTTAACC	CCTTCTCTTT	TGGAAGAACT	CGCTAAAGAA	TTAGGTTTTG	TAAAAAGAAA	4020
ACGAAAGTTT	TCAGGAAATG	AATTAGCTAC	CATATGTATC	TGGGGCAGTC	AACGTACAGC	4080
GAGTGATTCT	CTCGTTCGAC	TATGCAGTCA	ATTACACGCC	GCCACAGCAC	TCTTATGAGT	4140
CCAGAAGGAC	TCAATAAACG	CTTTGATAAA	AAAGCGGTTG	AATTTTTTGAA	ATATATTTTT	4200
TCTGCATTAT	GGAAAAGTAA	ACTTTGTAAA	ACATCAGCCA	TTTCAAGTGC	AGCACTCACG	4260
TATTTTCAAC	GAATCCGTAT	TTTAGATGCG	ACGATTTTCC	AAGTACCGAA	ACATTTAGCA	4320
CATGTATATC	CTGGGTCAGG	TGGTTGTGCA	CAAACCTGCAG			4360

(2) ИНФОРМАЦИЯ для последовательности ID №2

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 3474 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) тип нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: ДНК

(iii) гипотетическая: нет

(iv) антисмысловая: нет

(vi) источник:

(A) организм: чистый оптимизированный для кукурузы Вт Сгу1А/в/ ген

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID №2

ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG	60
GTGGAGGTGC TGGGCGGCCGA GCGGATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG	120
AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG	180
GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC	240
GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG	300
GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAGATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC	360
CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC	420
CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG	480
TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTGAGCGT GTTCGGCCAG	540
CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC	600
GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGC	660
CCCGACAGCC GCGACTGGAT CCGCTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG	720
CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG	780
AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT CTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC	840
CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG	900
AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG	960

ATCATGGCCA	GCCCCGTGGG	CTTCAGCGGC	CCCGAGTTCA	CCTTCCCCCT	GTACGGCACC	1020
ATGGGCAACG	CCGCCCCCA	GCAGCGCATC	GTGGCCCAGC	TGGGCCAGGG	CGTGTACCGC	1080
ACCCTGAGCA	GCACCCTGTA	CCGCCGCCCC	TTCAACATCG	GCATCAACAA	CCAGCAGCTG	1140
AGCGTGCTGG	ACGGCACCAG	GTTCGCCTAC	GGCACCAGCA	GCAACCTGCC	CAGCGCCGTG	1200
TACCGCAAGA	GCGGCACCGT	GGACAGCCTG	GACGAGATCC	CCCCCAGAA	CAACAACGTG	1260
CCCCCCCCGCC	AGGGCTTCAG	CCACCGCCTG	AGCCACGTGA	GCATGTTCCG	CAGCGGCTTC	1320
AGCAACAGCA	GCGTGAGCAT	CATCCGCGCC	CCCATGTTCA	GCTGGATCCA	CCGCAGCGCC	1380
GAGTTCAACA	ACATCATCCC	CAGCAGCCAG	ATCACCCAGA	TCCCCCTGAC	CAAGAGCACC	1440
AACCTGGGCA	GCGGCACCAG	CGTGGTGAAG	GGCCCCGGCT	TCACCGGCGG	CGACATCCTG	1500
CGCCGCACCA	GCCCCGGCCA	GATCAGCACC	CTGCGCGTGA	ACATCACCGC	CCCCCTGAGC	1560
CAGCGCTACC	GCGTGCGCAT	CCGCTACGCC	AGCACCACCA	ACCTGCAGTT	CCACACCAGC	1620
ATCGACGGCC	GCCCCATCAA	CCAGGGCAAC	TTCAGCGCCA	CCATGAGCAG	CGGCAGCAAC	1680
CTGCAGAGCG	GCAGCTTCCG	CACCGTGGGC	TTCACCACCC	CCTTCAACTT	CAGCAACGGC	1740
AGCAGCGTGT	TCACCCTGAG	CGCCCACGTG	TTCAACAGCG	GCAACGAGGT	GTACATCGAC	1800
CGCATCGAGT	TCGTGCCCCG	CGAGGTGACC	TTCGAGGCCG	AGTACGACCT	GGAGCGCGCC	1860
CAGAAGGCCG	TGAACGAGCT	GTTCAACAGC	AGCAACCAGA	TCGGCCTGAA	GACCGACGTG	1920
ACCGACTACC	ACATCGACCA	GGTGAGCAAC	CTGGTGGAGT	GCCTGAGCGA	CGAGTTCTGC	1980
CTGGACGAGA	AGAAGGAGCT	GAGCGAGAAG	GTGAAGCACG	CCAAGCGCCT	GAGCGACGAG	2040
CGCAACCTGC	TGCAGGACCC	CAACTTCCGC	GGCATCAACC	GCCAGCTGGA	CCGCGGCTGG	2100
CGCGGCAGCA	CCGACATCAC	CATCCAGGGC	GGCGACGACG	TGTTCAAGGA	GAATACTGTG	2160
ACCCTGCTGG	GCACCTTCGA	CGAGTGCTAC	CCCACCTACC	TGTACCAGAA	GATCGACGAG	2220
AGCAAGCTGA	AGGCCTACAC	CCGCTACCAG	CTGCGCGGCT	ACATCGAGGA	CAGCCAGGAC	2280
CTGGAGATCT	ACCTGATCCG	CTACAACGCC	AAGCACGAGA	CCGTGAACGT	GCCCCGCACC	2340
GGCAGCCTGT	GGCCCCCTGAG	CGCCCCCAGC	CCCATCGGCA	AGTGCGCCCA	CCACAGCCAC	2400
CACTTCAGCC	TGGACATCGA	CGTGGGCTGC	ACCGACCTGA	ACGAGGACCT	GGGCGTGTGG	2460
GTGATCTTCA	AGATCAAGAC	CCAGGACGGC	CACGCCCGCC	TGGGCAACCT	GGAGTTCCTG	2520
GAGGAGAAGC	CCCTGGTGGG	CGAGGCCCTG	GCCCCGCTGA	AGCGCGCCGA	GAAGAAGTGG	2580

CGCGACAAGC GCGAGAAGCT GGAGTGGGAG ACCAACATCG TGTACAAGGA GGCCAAGGAG	2640
AGCGTGGACG CCCTGTTTCGT GAACAGCCAG TACGACCGCC TGCAGGCCGA CACCAACATC	2700
GCCATGATCC ACGCCGCCGA CAAGCGCGTG CACAGCATCC GCGAGGCCTA CCTGCCCCGAG	2760
CTGAGCGTGA TCCCCGGCGT GAACGCCGCC ATCTTCGAGG AGCTGGAGGG CCGCATCTTC	2820
ACCGCCTTCA GCCTGTACGA CGCCCGCAAC GTGATCAAGA ACGGCGACTT CAACAACGGC	2880
CTGAGCTGCT GGAACGTGAA GGGCCACGTG GACGTGGAGG AGCAGAACAA CCACCGCAGC	2940
GTGCTGGTGG TGCCCCGAGTGG GAGGCGCGAG GTGAGCCAGG AGGTGCGCGT GTGCCCCGGC	3000
CGCGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC	3060
ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG CTGAAGTTCA GCAACTGCGT GGAGGAGGAG	3120
GTGTACCCCA ACAACACCGT GACCTGCAAC GACTACACCG CCACCCAGGA GGAGTACGAG	3180
GGCACCTACA CCAGCCGCAA CCGCGGCTAC GACGGCGCCT ACGAGAGCAA CAGCAGCGTG	3240
CCCGCCGACT ACGCCAGCGC CTACGAGGAG AAGGCCTACA CCGACGGCCG CCGCGACAAC	3300
CCCTGCGAGA GCAACCGCGG CTACGGCGAC TACACCCCCC TGCCCCCGG CTACGTGACC	3360
AAGGAGCTGG AGTACTTCCC CGAGACCGAC AAGGTGTGGA TCGAGATCGG CGAGACCGAG	3420
GGCACCTTCA TCGTGGACAG CGTGGAGCTG CTGCTGATGG AGGAGTAGTA CATG	3474

(2) ИНФОРМАЦИЯ для последовательности ID №3

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 1961 пара оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) тип нитей: одонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: ДНК

(iii) гипотетическая: нет

(iv) антисмысловая: нет

(vi) источник:

(A) организм: усеченный синтетический оптимизированный для кукурузы Bt Cry1A/b/ ген

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID №3

GATCCAACAA TGGACAACAA CCCCACATC AACGAGTGCA TCCCCTACAA CTGCCTGAGC	60
--	----

RU 2202611 C2

RU 2202611 C2

AACCCCGAGG	TGGAGGTGCT	GGGCGGCGAG	CGCATCGAGA	CCGGCTACAC	CCCCATCGAC	120
ATCAGCCTGA	GCCTGACCCA	GTTCTTGCTG	AGCGAGTTCG	TGCCCCGGCG	CGGCTTCGTG	180
CTGGGCCTGG	TGGACATCAT	CTGGGGCATC	TTCGGCCCCA	GCCAGTGGA	CGCCTTCCTG	240
GTGCAGATCG	AGCAGCTGAT	CAACCAGCGC	ATCGAGGAGT	TCGCCCCGAA	CCAGGCCATC	300
AGCCGCCTGG	AGGGCCTGAG	CAACCTGTAC	CAAATCTACG	CCGAGAGCTT	CCGCGAGTGG	360
GAGGCCGACC	CCACCAACCC	CGCCCTGCGC	GAGGAGATGC	GCATCCAGTT	CAACGACATG	420
AACAGCGCCC	TGACCACCGC	CATCCCCCTG	TTCGCCGTGC	AGAACTACCA	GGTGCCCCCTG	480
CTGAGCGTGT	ACGTGCAGGC	CGCCAACCTG	CACCTGAGCG	TGCTGCGCGA	CGTCAGCGTG	540
TTCGGCCAGC	GCTGGGGCTT	CGACGCCGCC	ACCATCAACA	GCCGCTACAA	CGACCTGACC	600
CGCCTGATCG	GCAACTACAC	CGACCACGCC	GTGCGCTGGT	ACAACACCGG	CCTGGAGCGC	660
GTGTGGGGTC	CCGACAGCCG	CGACTGGATC	AGGTACAACC	AGTTCCGCCG	CGAGCTGACC	720
CTGACCGTGC	TGGACATCGT	GAGCCTGTTC	CCCAACTACG	ACAGCCGCAC	CTACCCCATC	780
CGCACCGTGA	GCCAGCTGAC	CCGCGAGATT	TACACCAACC	CCGTGCTGGA	GAACCTCGAC	840
GGCAGCTTCC	GCGGCAGCGC	CCAGGGCATC	GAGGGCAGCA	TCCGCAGCCC	CCACCTGATG	900
GACATCCTGA	ACAGCATCAC	CATCTACACC	GACGCCACC	GCGGCGAGTA	CTACTGGAGC	960
GGCCACCAGA	TCATGGCCAG	CCCCGTGCGC	TTCAGCGGCC	CCGAGTTCAC	CTTCCCCCTG	1020
TACGGCACCA	TGGGCAACGC	TGCACCTCAG	CAGCGCATCG	TGGCACAGCT	GGGCCAGGGA	1080
GTGTACCGCA	CCCTGAGCAG	CACCCTGTAC	CGTCGACCTT	TCAACATCGG	CATCAACAAC	1140
CAGCAGCTGA	GCGTGCTGGA	CGGCACCGAG	TTCGCCTACG	GCACCAGCAG	CAACCTGCCC	1200
AGCGCCGTGT	ACCGCAAGAG	CGGCACCGTG	GACAGCCTGG	ACGAGATCCC	CCCTCAGAAC	1260
AACAACGTGC	CACCTCGACA	GGGCTTCAGC	CACCGTCTGA	GCCACGTGAG	CATGTTCCGC	1320
AGTGGCTTCA	GCAACAGCAG	CGTGAGCATC	ATCCGTGCAC	CTATGTTTAC	CTGGATTAC	1380
CGCAGTGCCG	AGTTCAACAA	CATCATCCCC	AGCAGCCAGA	TCACCCAGAT	CCCCCTGACC	1440
AAGAGCACCA	ACCTGGGCAG	CGGCACCAGC	GTGGTGAAGG	GCCCCGGCTT	CACCGGCGGC	1500
GACATCCTGC	GCCGCACCAG	CCCCGGCCAG	ATCAGCACCC	TGCGCGTGAA	CATCACCGCC	1560
CCCCTGAGCC	AGCGCTACCG	CGTCCGCATC	CGCTACGCCA	GCACCACCAA	CCTGCAGTTC	1620
CACACCAGCA	TCGACGGCCG	CCCCATCAAC	CAGGGCAACT	TCAGCGCCAC	CATGAGCAGC	1680

GGCAGCAACC TGCAGAGCGG CAGCTTCCGC ACCGTGGGCT TCACCACCCC CTTCAACTTC	1740
AGCAACGGCA GCAGCGTGTT CACCCTGAGC GCCCAGTGT TCAACAGCGG CAACGAGGTG	1800
TACATCGACC GCATCGAGTT CGTGCCCGCC GAGGTGACCT TCGAGGCCGA GTACGACCTG	1860
GAGAGGGCTC AGAAGGCCGT GAACGAGCTG TTCACCAGCA GCAACCAGAT CGGCCTGAAG	1920
ACCGACGTGA CCGACTACCA CATCGATCAG GTGTAGGAGC T	1961

(2) ИНФОРМАЦИЯ для последовательности ID №4

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 3508 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) тип нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: ДНК

(iv) антисмысловая: нет

(vi) источник:

(A) организм:

полной длины синтетический оптимизированный для кукурузы Вт CgylA/b/ ген

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID №4

GATCCAACAA TGGACAACAA CCCCACATC AACGAGTGCA TCCCCTACAA CTGCCTGAGC	60
AACCCCGAGG TGGAGGTGCT GGGCGGCGAG CGCATCGAGA CCGGCTACAC CCCCATCGAC	120
ATCAGCCTGA GCCTGACCCA GTTCCTGCTG AGCGAGTTCG TGCCCGGCGC CGGCTTCGTG	180
CTGGGCCTGG TGGACATCAT CTGGGGCATC TTCGGCCCCA GCCAGTGGGA CGCCTTCCTG	240
GTGCAGATCG AGCAGCTGAT CAACCAGCGC ATCGAGGAGT TCGCCCGCAA CCAGGCCATC	300
AGCCGCCTGG AGGGCCTGAG CAACCTGTAC CAAATCTACG CCGAGAGCTT CCGCGAGTGG	360
GAGGCCGACC CCACCAACCC CGCCCTGCGC GAGGAGATGC GCATCCAGTT CAACGACATG	420
AACAGCGCCC TGACCACCGC CATCCCCCTG TTCGCCGTGC AGAACTACCA GGTGCCCTG	480
CTGAGCGTGT ACGTGCAGGC CGCCAACCTG CACCTGAGCG TGCTGCGCGA CGTCAGCGTG	540
TTCGGCCAGC GCTGGGGCTT CGACGCCGCC ACCATCAACA GCCGCTACAA CGACCTGACC	600
CGCCTGATCG GCAACTACAC CGACCACGCC GTGCGCTGGT ACAACACCGG CCTGGAGCGC	660
GTGTGGGGTC CCGACAGCCG CGACTGGATC AGGTACAACC AGTTCCGCCG CGAGCTGACC	720

RU 2202611 C2

RU 2202611 C2

CTGACCGTGC	TGGACATCGT	GAGCCTGTTC	CCCAACTACG	ACAGCCGCAC	CTACCCCATC	780
CGCACCGTGA	GCCAGCTGAC	CCGCGAGATT	TACACCAACC	CCGTGCTGGA	GAACCTCGAC	840
GGCAGCTTCC	GCGGCAGCGC	CCAGGGCATC	GAGGGCAGCA	TCCGCAGCCC	CCACCTGATG	900
GACATCCTGA	ACAGCATCAC	CATCTACACC	GACGCCCACC	GCGGCGAGTA	CTACTGGAGC	960
GGCCACCAGA	TCATGGCCAG	CCCCGTGCGC	TTCAGCGGCC	CCGAGTTCAC	CTTCCCCCTG	1020
TACGGCACCA	TGGGCAACGC	TGCACCTCAG	CAGCGCATCG	TGGCACAGCT	GGGCCAGGGA	1080
GTGTACCGCA	CCCTGAGCAG	CACCCTGTAC	CGTCGACCTT	TCAACATCGG	CATCAACAAC	1140
CAGCAGCTGA	GCGTGCTGGA	CGGCACCGAG	TTCGCCTACG	GCACCAGCAG	CAACCTGCCC	1200
AGCGCCGTGT	ACCGCAAGAG	CGGCACCGTG	GACAGCCTGG	ACGAGATCCC	CCCTCAGAAC	1260
AACAACGTGC	CACCTCGACA	GGGCTTCAGC	CACCGTCTGA	GCCACGTGAG	CATGTTCCGC	1320
AGTGGCTTCA	GCAACAGCAG	CGTGAGCATC	ATCCGTGCAC	CTATGTTTCA	CTGGATTAC	1380
CGCAGTGCCG	AGTTCAACAA	CATCATCCCC	AGCAGCCAGA	TCACCCAGAT	CCCCCTGACC	1440
AAGAGCACCA	ACCTGGGCAG	CGGCACCAGC	GTGGTGAAGG	GCCCCGGCTT	CACCGGCGGC	1500
GACATCCTGC	GCCGCACCAG	CCCCGGCCAG	ATCAGCACCC	TGCGCGTGAA	CATCACCGCC	1560
CCCCTGAGCC	AGCGCTACCG	CGTCCGCATC	CGCTACGCCA	GCACCACCAA	CCTGCAGTTC	1620
CACACCAGCA	TCGACGGCCG	CCCCATCAAC	CAGGGCAACT	TCAGCGCCAC	CATGAGCAGC	1680
GGCAGCAACC	TGCAGAGCGG	CAGCTTCCGC	ACCGTGGGCT	TCACCACCCC	CTTCAACTTC	1740
AGCAACGGCA	GCAGCGTGTT	CACCCTGAGC	GCCCACGTGT	TCAACAGCGG	CAACGAGGTG	1800
TACATCGACC	GCATCGAGTT	CGTGCCCGCC	GAGGTGACCT	TCGAGGCCGA	GTACGACCTG	1860
GAGAGGGGCTC	AGAAGGCCGT	GAACGAGCTG	TTCACCAGCA	GCAACCAGAT	CGGCCTGAAG	1920
ACCGACGTGA	CCGACTACCA	CATCGATCAG	GTGAGCAACC	TGGTGGAGTG	CCTGAGCGAC	1980
GAGTTCTGCC	TGGACGAGAA	GAAGGAGCTG	AGCGAGAAGG	TGAAGCACGC	CAAGCGCCTG	2040
AGCGACGAGC	GCAACCTGCT	GCAGGACCCC	AACTTCCGCG	GCATCAACCG	CCAGCTGGAC	2100
CGCGGCTGGC	GCGGCAGCAC	CGACATCACC	ATCCAGGGCG	GCGACGACGT	GTTCAAGGAG	2160
AACTACGTGA	CCCTGCTGGG	CACCTTCGAC	GAGTGCTACC	CCACCTACCT	GTACCAGAAG	2220
ATCGACGAGA	GCAAGCTGAA	GGCCTACACC	CGCTACCAGC	TGCGCGGCTA	CATCGAGGAC	2280
AGCCAGGACC	TGGAGATCTA	CCTGATCCGC	TACAACGCCA	AGCACGAGAC	CGTGAACGTG	2340

CCCGGCACCG GCAGCCTGTG GCCCCTGAGC GCCCCAGCC CCATCGGCAA GTGCGCCCAC	2400
CACAGCCACC ACTTCAGCCT GGACATCGAC GTGGGCTGCA CCGACCTGAA CGAGGACCTG	2460
GGCGTGTGGG TGATCTTCAA GATCAAGACC CAGGACGGCC ACGCCCGCCT GGGCAACCTG	2520
GAGTTCCTGG AGGAGAAGCC CCTGGTGGGC GAGGCCCTGG CCCGCGTGAA GCGCGCCGAG	2580
AAGAAGTGGC GCGACAAGCG CGAGAAGCTG GAGTGGGAGA CCAACATCGT GTACAAGGAG	2640
GCCAAGGAGA GCGTGGACGC CCTGTTCGTG AACAGCCAGT ACGACCGCCT GCAGGCCGAC	2700
ACCAACATCG CCATGATCCA CGCCGCCGAC AAGCGCGTGC ACAGCATTCG CGAGGCCTAC	2760
CTGCCCAGAGC TGAGCGTGAT CCCCAGCGTG AACGCCGCCA TCTTCGAGGA GCTGGAGGGC	2820
CGCATCTTCA CCGCCTTCAG CCTGTACGAC GCCCACAACG TGATCAAGAA CGGCGACTTC	2880
AACAACGGCC TGAGCTGCTG GAACGTGAAG GGCCACGTGG ACGTGGAGGA GCAGAACAAC	2940
CACCGCAGCG TGCTGGTGGT GCCCAGAGTG GAGGCCGAGG TGAGCCAGGA GGTGCGCGTG	3000
TGCCCCGGCC GCGGCTACAT CCTGCGCGTG ACCGCCCTACA AGGAGGGCTA CGGCGAGGGC	3060
TGCGTGACCA TCCACGAGAT CGAGAACAAC ACCGACGAGC TCAAGTTCAG CAACTGCGTG	3120
GAGGAGGAGG TGTACCCCAA CAACACCGTG ACCTGCAACG ACTACACCGC CACCCAGGAG	3180
GAGTACGAGG GCACCTACAC CAGCCGCAAC CGCGGCTACG ACGGCGCCTA CGAGAGCAAC	3240
AGCAGCGTGC CCGCCGACTA CGCCAGCGCC TACGAGGAGA AGGCCTACAC CGACGGCCGC	3300
CGCGACAACC CCTGCGAGAG CAACCGCGGC TACGGCGACT ACACCCCCCT GCCCGCCGGC	3360
TACGTGACCA AGGAGCTGGA GTACTTCCCC GAGACCGACA AGGTGTGGAT CGAGATCGGC	3420
GAGACCGAGG GCACCTTCAT CGTGGACAGC GTGGAGCTGC TGCTGATGGA GGAGTAGTAC	3480
ATGTGATAGT ACGTAAGCTC GAGGATCT	3508

(2) ИНФОРМАЦИЯ для последовательности ID №5

(i) характеристика последовательности:

(A) длина: 1845 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) тип нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: ДНК

(iv) антисмысловая: нет

(vi) источник:

(A) организм: усеченный синтетический Bt ген (Perlak et al.)

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:SEQ ID №5

ATGGACAACA	ACCCAAACAT	CAACGAATGC	ATTCCATACA	ACTGCTTGAG	TAACCCAGAA	60
GTTGAAGTAC	TTGGTGGAGA	ACGCATTGAA	ACCGGTTACA	CTCCCATCGA	CATCTCCTTG	120
TCCTTGACAC	AGTTTCTGCT	CAGCGAGTTC	GTGCCAGGTG	CTGGGTTCGT	TCTCGGACTA	180
GTTGACATCA	TCTGGGGTAT	CTTTGGTCCA	TCTCAATGGG	ATGCATTCCCT	GGTGCAAATT	240
GAGCAGTTGA	TCAACCAGAG	GATCGAAGAG	TTCGCCAGGA	ACCAGGCCAT	CTCTAGGTTG	300
GAAGGATTGA	GCAATCTCTA	CCAAATCTAT	GCAGAGAGCT	TCAGAGAGTG	GGAAGCCGAT	360
CCTACTAACC	CAGCTCTCCG	CGAGGAAATG	CGTATTCAAT	TCAACGACAT	GAACAGCGCC	420
TTGACCACAG	CTATCCCATT	GTTTCGCAGTC	CAGAACTACC	AAGTTCCTCT	CTTGTCCTTG	480
TACGTTCAAG	CAGCTAATCT	TCACCTCAGC	GTGCTTCGAG	ACGTTAGCGT	GTTTGGGGCAA	540
AGGTGGGGAT	TCGATGCTGC	AACCATCAAT	AGCCGTTACA	ACGACCTTAC	TAGGCTGATT	600
GGAAACTACA	CCGACCACGC	TGTTCTGTTGG	TACAACACTG	GCTTGGAGCG	TGTCTGGGGT	660
CCTGATTCTA	GAGATTGGAT	TAGATACAAC	CAGTTCAGGA	GAGAATTGAC	CCTCACAGTT	720
TTGGACATTG	TGTCTCTCTT	CCCGAACTAT	GACTCCAGAA	CCTACCCTAT	CCGTACAGTG	780
TCCCAACTTA	CCAGAGAAAT	CTATACTAAC	CCAGTTCTTG	AGAACTTCGA	CGGTAGCTTC	840
CGTGGTTCTG	CCCAAGGTAT	CGAAGGCTCC	ATCAGGAGCC	CACACTTGAT	GGACATCTTG	900
AACAGCATAA	CTATCTACAG	CGATGCTCAC	AGAGGAGAGT	ATTACTGGTC	TGGACACCAG	960
ATCATGGCCT	CTCCAGTTGG	ATTTCAGCGGG	CCCGAGTTTA	CCTTTCCTCT	CTATGGAACCT	1020
ATGGGAAACG	CCGCTCCACA	ACAACGTATC	GTTGCTCAAC	TAGGTCAGGG	TGTCTACAGA	1080
ACCTTGTCTT	CCACCTTGTA	CAGAAGACCC	TTCAATATCG	GTATCAACAA	CCAGCAACTT	1140
TCCGTTCTTG	ACGGAACAGA	GTTTCGCTAT	GGAACCTCTT	CTAACTTGCC	ATCCGCTGTT	1200
TACAGAAAGA	GCGGAACCGT	TGATTCTCTG	GACGAAATCC	CACCACAGAA	CAACAATGTG	1260
CCACCCAGGC	AAGGATTCTC	CCACAGGTTG	AGCCACGTGT	CCATGTTCCG	TTCCGGATTC	1320
AGCAACAGTT	CCGTGAGCAT	CATCAGAGCT	CCTATGTTCT	CATGGATTCA	TCGTAGTGCT	1380
GAGTTCAACA	ATATCATTC	TTCCTCTCAA	ATCACCCTAA	TCCCATTGAC	CAAGTCTACT	1440
AACCTTGGAT	CTGGAACCTC	TGTCGTGAAA	GGACCAGGCT	TCACAGGAGG	TGATATTCTT	1500
AGAAGAACTT	CTCCTGGCCA	GATTAGCACC	CTCAGAGTTA	ACATCACTGC	ACCACTTTCT	1560
CAAAGATATC	GTGTCAGGAT	TCGTTACGCA	TCTACCACTA	ACTTGCAATT	CCACACCTCC	1620
ATCGACGGAA	GGCCTATCAA	TCAGGGTAAC	TTCTCCGCAA	CCATGTCAAG	CGGCAGCAAC	1680
TTGCAATCCG	GCAGCTTCAG	AACCGTCGGT	TTCATACTC	CTTTCAACTT	CTCTAACGGA	1740
TGAAGCGTTT	TCACCCTTAG	CGCTCATGTG	TTCAATTCTG	GCAATGAAGT	GTACATTGAC	1800
CGTATTGAGT	TTGTGCCTGC	CGAAGTTACC	TTCGAGGCTG	AGTAC		1845

	10	20	30	40	50	60
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCTGAA					
flsynbt.fin	C.....C.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....CC.G.....C.....G					
bssyn	C.....C.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....CC.G.....C.....G					
	70	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTG					
flsynbt.fin	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
bssyn	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCGCTAACGCAATTTCTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTA					
flsynbt.fin	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C.....C.G..C..G					
bssyn	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C.....C.G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTACAAATT					
flsynbt.fin	..G..C..C..C.....C..C..C..C...AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
bssyn	..G..C..C..C.....C..C..C..C...AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GAACAGTTAATTAACCAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
flsynbt.fin	..G...C.G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
bssyn	..G...C.G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAAICTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT					
flsynbt.fin	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
bssyn	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCC					
flsynbt.fin	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
bssyn	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CTTACAACCGCTATTCTCTTTTGCAGTTCAAAATTATCAAGTTCTCTTTTATCAGTA					
flsynbt.fin	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
bssyn	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTGTGAGAGATGTTTCAGTGTGTTGGACAA					
flsynbt.fin	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C.C..C..CAGC.....C..C..G					
bssyn	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C.C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGGTGGGGATTTGATGCCCGGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT					
flsynbt.fin	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					
bssyn	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					

Фиг. 1

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
flsynbt.fin	...C.C..G....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T....C.....					
bssyn	...C.C..G....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T....C.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTTCAGGCTTT					
flsynbt.fin	C.A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT....C					
bssyn	C.A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT....C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATACATCGTAGTGCT					
flsynbt.fin	..C..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
bssyn	..C..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	
	*	*	*	*	*	
BTHKURHD	GAATTTAATAATATAATTTCCTTCATCA--CAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTA					
flsynbt.fin	..G..C..C..C..C..C..C..--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					
bssyn	..G..C..C..C..C..C..C..--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTGCTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTC					
flsynbt.fin	.C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C..C..C..C.					
bssyn	.C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C..C..C..C.					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TTCGAAGAAGCTTCACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT					
flsynbt.fin	.G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
bssyn	.G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CACAAAGATATCGGGTAAGAATTGCTACGCTTCTACCACAAATTTACAATTCATACAT					
flsynbt.fin	GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
bssyn	GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTA					
flsynbt.fin	GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
bssyn	GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATG					
flsynbt.fin	.CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
bssyn	.CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG					
flsynbt.fin	.CAGC..C..G..C..C..CC.G..C..C..C..G.....CAGC.....C..G..G..C..C.					
bssyn	.CAGC..C..G..C..C..CC.G..C..C..C..G.....CAGC.....C..G..G..C..C.					

	1800	1810	1820	1830	1840	1850
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAGAG					
flsynbt.fin	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..C..CC.G..G..G.					
bssyn	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..C..CC.G..G..G.					
	1860	1870	1880	1890	1900	1910
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CACAAAAGGCGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAATCAAATCGGGTTAAAAACAGATG					
flsynbt.fin	.T..G.....C.....C.....C..CAGCAG...C..G.....CC.G..G..C..C.					
bssyn	.T..G.....C.....C.....C..CAGCAG...C..G.....CC.G..G..C..C.					
	1920	1930	1940	1950	1960	1970
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TGACGGATTATCATATTGATCAAGTATCCAATTTAGTTGAGTGTTTATCTGATGAATTTT					
flsynbt.fin	C..C..C..C..C.....G..GAG...CC.G..G.....CC.GAGC..C..G..C.					
bssyn	C..C..C..C..C.....-----					
	1980	1990	2000	2010	2020	2030
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTCTGGATGAAAAAAGAATTGTCCGAGAAAGTCAAACATGCGAAGCGACTTAGTGATG					
flsynbt.fin	.C.....C..G..G..G..GC..AG.....G..G..G..C..C.....C..G..C..C.					
bssyn	-----					
	2040	2050	2060	2070	2080	2090
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGCGGAATTTACTTCAAGATCCAAACTTTAGAGGGATCAATAGACAAGTAGACCGTGGCT					
flsynbt.fin	C..CC.G..G..G..C..C.....CC.C..C.....CC.C..G..G.....C....					
bssyn	-----					
	2100	2110	2120	2130	2140	2150
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GGAGAGGAAGTACGGATATTACCATCCAAGGAGGCGATGACGTATTCAAAGAGAATTACG					
flsynbt.fin	..C.C..C..C..C..C.....G..C.....C.....G.....G.....C....					
bssyn	-----					
	2160	2170	2180	2190	2200	2210
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TTACGCTATTGGGTACCTTTGATGAGTGCTATCCAACGTATTTATATCAAAAAATAGATG					
flsynbt.fin	.G..C..GC....C.....C..C.....C..C..C..CC.G..C..G..G..C..C.					
bssyn	-----					
	2220	2230	2240	2250	2260	2270
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGTCGAAATTAAAAGCCTATACCCGTTACCAATTAAGAGGGTATATCGAAGATAGTCAAG					
flsynbt.fin	..AGC..GC.G..G.....C.....C.....GC.GC.C..C..C.....G..C..C..G.					
bssyn	-----					
	2280	2290	2300	2310	2320	2330
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ACTTAGAAATCTATTTAATTCGCTACAATGCCAAACACGAAACAGTAAATGTGCCAGGTA					
flsynbt.fin	..C.G..G.....CC.G..C.....C.....G.....G..C..G..C.....C..C.					
bssyn	-----					
	2340	2350	2360	2370	2380	2390
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CGGGTTCCTTATGGCCGCTTTCAGCCCCAAGTCCAATCGGAAATGTGCCCATCATTC					
flsynbt.fin	.C..CAG.C.G.....C..GAGC.....C..C..C.....C..G..C.....C..CAG..					
bssyn	-----					

Фиг. 1 (продолжение)

	2400	2410	2420	2430	2440	2450
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCATTCTCTCTGGACATTGATGTTGGATGTACAGACTTAAATGAGGACTTAGGTGTAT					
bssyn	.C..C...AG.C.....C..C..G..C..C..C...C.G..C.....C.G..C..G.					

	2460	2470	2480	2490	2500	2510
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGGTGATATTCAAGATTAAGACGCAAGATGGCCATGCAAGACTAGGAAATCTAGAATTC					
bssyn	C.....C.....C..G..C.....C..CC.C..G..C..C..G..G..C.					

	2520	2530	2540	2550	2560	2570
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCGAAGAGAAACCATTAGTAGGAGAAGCACTAGCTCGTGTGAAAAGAGCGGAGAAAAAT					
bssyn	.G..G.....G..CC.G..G..C..G..C..G..C..C.....GC.C..C.....G..G.					

	2580	2590	2600	2610	2620	2630
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGAGAGACAAACGTGAAAAATTGGAATGGGAAACAAATATTGTTTATAAAGAGGCAAAAG					
bssyn	..C.C.....G..C..G..GC....G.....G..C..C..C..G..C..G.....C..G.					

	2640	2650	2660	2670	2680	2690
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AATCTGTAGATGCTTTATTTGTAACTCTCAATATGATAGATTACAAGCGGATACCAACA					
bssyn	.GAGC..G..C..CC.G..C..G...AGC..G..C..CC.CC.G..G..C..C.....					

	2700	2710	2720	2730	2740	2750
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCGCGATGATTTCATGCGGCAGATAAACGCGTTCAATAGCATTGAGAGAGCTTATCTGCCTG					
bssyn	..C..C.....C..C..C..C..C..G.....G..C.....C..G..C..C.....C.					

	2760	2770	2780	2790	2800	2810
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGCTATTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTT					
bssyn	AGC.....C..C..C..G..C..C..C..C..C..G..GC.G..G..C..C..C..C.					

	2820	2830	2840	2850	2860	2870
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAGAAATGTCATTAAAAATGGTGATTTTAATAATG					
bssyn	C..C...AG...G..C..C..CC.C..C..G..C..G..C..C..C..C..C..C.					

	2880	2890	2900	2910	2920	2930
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GCTTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAAACAACCACCGTT					
bssyn	..C.GAG.....G..C..C..C..G..C..G..G..G.....CA					

	2940	2950	2960	2970	2980	2990
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGGTCCTTGTTGTTCCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTACACAAGAAGTTCGTGTCTGTCCGG					
bssyn	GC..G..G..G..G..C..G.....G..C..G...AGC..G..G..G..C..G..C..C.					

Фиг. 1 (продолжение)

	3000	3010	3020	3030	3040	3050
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGCGTACAAGGAGGGATATGGAGAAGGTTGCGTAA					
flsynbt.fin	.C..C.....C.....G..C..G..C..C.....C..C..C..G..C.....G.					
bssyn	-----					
	3060	3070	3080	3090	3100	3110
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCATTCATGAGATCGAGAACAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGTGTAGAAGAGG					
flsynbt.fin	C..C.....C.....G..C.....C.....C..G..G....					
bssyn	-----					
	3120	3130	3140	3150	3160	3170
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AAGTATATCCAAACAACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGCGACTCAAGAAGAATATG					
flsynbt.fin	.G..G..C..C.....C..G..C..C..C..C..C..C..C..G..G..G..C.					
bssyn	-----					
	3180	3190	3200	3210	3220	3230
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGGGTACGTACACTTCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTG					
flsynbt.fin	C..C.....CAGC..C..C..C..C.....C.....C..G.....CAGCAGC.					
bssyn	-----					
	3240	3250	3260	3270	3280	3290
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TACCAGCTGATTATGCATCAGCCTATGAAGAAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACA					
flsynbt.fin	.G..C..C..C..C..CAGC....C..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C....					
bssyn	-----					
	3300	3310	3320	3330	3340	3350
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATCCTTGTGAATCTAACAGAGGATATGGGGATTACACACCACTACCAGCTGGCTATGTGA					
flsynbt.fin	.C..C..C..GAGC...C..C..C..C..C.....C..C..G..C..C.....C....					
bssyn	-----					
	3360	3370	3380	3390	3400	3410
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CAAAAGAATTAGAGTACTTCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGG					
flsynbt.fin	.C..G..GC.G.....C..G.....C.....G.....C.....C..G..C.					
bssyn	-----					
	3420	3430	3440	3450	3460	
	*	*	*	*	*	
BTHKURHD	AAGGAACATTTCATCGTGGACAGCGTGGAATTACTTCTTATGGAGGAATAA					
flsynbt.fin	.G..C..C.....GC.G..G..G.....G..G					
bssyn	-----TG..G					

Фиг. 1 (продолжение)

	10	20	30	40	50	60
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAGTAACCCCTGAA					
	C.....C..C.....C..G.....C..C..C..C..CC.G..C.....C..G					
	70	80	90	100	110	120
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAAGAATAGAAAAGTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTCTG					
	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTTGTGTAGGACTA					
	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C.G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
PTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTAACAATT					
	..G..C..C..C.....C..C..C..C..AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
	..G...C.G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT					
	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCTACTAATCCAGCAITTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACAIGAACAGTGCC					
	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
	430	440	450	460	470	480
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGCAGTTCAAAAATTATCAAGTTCCCTCTTTTATCAGTA					
	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TATGTTCAAGCTGCAAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTTTGGACAA					
	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT					
	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					
	610	620	630	640	650	660
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA					
	C..C..C..C..C..G.....C..C..CC.G.....C..G.....T					
	670	680	690	700	710	720
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA					
	..C..CAGCC.C..C.....C..G..C..C..G..CC.CC.C..GC.G..C..G..C..G					

Фиг. 2

	610	620	630	640	650	660
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA					
bssyn	C..C..C..C..G.....C..C..CC.G.....C..G.....T					
	670	680	690	700	710	720
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA					
bssyn	..C..CAGCC.C..C.....C..G..C..C..G..CC.CC.C..GC.G..C..G..C..G					
	730	740	750	760	770	780
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCGGAACATATGATAGTAGAACGTATCCAATTCGAACAGTT					
bssyn	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
bssyn	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..G..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
bssyn	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAATATTATTGGTCAGGGCATCAA					
bssyn	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..G..C..C..C..AGC..C..C..G					
	970	980	990	1000	1010	1020
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCGGGGCCAGAATTCACTTTTCCGCTATATGGAAC					
bssyn	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGA					
bssyn	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGGATAAATAATCAACAAC					
bssyn	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
bssyn	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C..AG.AGC..CC.....CAG...C..G					

Фиг. 2 (продолжение)

	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAACATATGATAGTAGAACGTATCCAATTCGAACAGTT					
bssyn	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCCCAATTAACAAGAGAAAATTATACAAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
bssyn	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..G..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
bssyn	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAATATTATTGGTCAGGGCATCAA					
bssyn	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..G..C..C...AGC..C..C..G					
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCCGGGGCCAGAATTCACCTTTTCCGCTATATGGAAC					
bssyn	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGA					
bssyn	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGGATAAATAATCAACAAC					
bssyn	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCTGTTCTTGACGGGACAGAAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
bssyn	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C..C..AG.AGC..CC....CAG...C..G					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
bssyn	...C.C..G.....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T.....C.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTTCAGGCTTT					
bssyn	C.A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT.....C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATACATCGTAGTGCT					
bssyn	..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	
	*	*	*	*	*	
BTHKURHD	GAATTTAATAATATAATTCCTTCATCA--CAATTAACACAAATACSTTTAACAAAAATCTA					
bssyn	..G..C..C..C..C..C..C..--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					

Фиг. 2 (продолжение)

	1440	1450	1460	1470	1480	1490
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTAATCTTGGCTCTGGA	ACTTCTGTTCGTTAAAGGACCAGGATT	TACAGGAGGAGATATTC			
	.C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C.					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TTCGAAGA	ACTTCACCTGGCCAGATT	TCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT			
	.G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CACAAAGATATCGGGTAAGAATT	CGCTACGCTTCTACCA	CAAATTTACAAT	TCCATACAT		
	GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTT	CAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTA				
	GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTT	ACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATG				
	.CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GATCAAGTG	TATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG				
	.CAGC..C..G..C..CC.G..C..C..C..G.....CAGC.....C..G..G..C..C.					
	1800	1810	1820	1830	1840	1850
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAGAG					
	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..C..CC.G..G..G.					
	1860	1870	1880	1890	1900	1910
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CACAAAAGGCGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAATCAAATCGGGTTAAAAACAGATG					
	.T..G.....C.....C.....C..CAGCAG...C..G.....CC.G..G..C..C.					
	1920	1930	1940			
BTHKURHD	*	*	*			
bssyn	TGACGGATTATCATATTGATCAAGTATCC					
	C..C..C..C..C.....G..G.AG					

	10	20	30	40	50	60
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	ATGGACAACAACCCCAACATCAACGAGTGCATCCCTACAACCTGCCTGAGCAACCCCGAG					
bssyn						
synful.mod						
	70	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	GTGGAGGTGCTGGGCGGCGAGCGCATCGAGACCGGCTACACCCCATCGACATCAGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	AGCCTGACCCAGTTCCTGCTGAGCGAGTTCGTGCCCCGGCGCCGGCTTCGTGCTGGGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	190	200	210	220	230	240
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	GTGGACATCATCTGGGGCATCTTCGGCCCCAGCCAGTGGGACGCCTTCCTGGTGCAGATC					
bssyn						
synful.mod						
	250	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	GAGCAGCTGATCAACCAGCGCATCGAGGAGTTCGCCCCGAACCAGGCCATCAGCCGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	310	320	330	340	350	360
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	GAGGGCTGAGCAACCTGTACCAGATCTACGCCGAGAGCTTCGCGAGTGGGAGGCCGAC					
bssyn	A.....					
synful.mod	A.....					
	370	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CCCACCAACCCCGCCCTGCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCC					
bssyn						
synful.mod						
	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CTGACCACCGCCATCCCCCTGTTGCGCGTGCGAGAACTACCAGGTGCCCTGCTGAGCGTG					
bssyn						
synful.mod						
	490	500	510	520	530	540
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	TACGTGCAGGCCGCCAACCTGCACCTGAGCGTGCTGCGCGACGTGAGCGTGTTTCGGCCAG					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	550	560	570	580	590	600
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CGCTGGGGCTTCGACGCCGCCACCATCAACAGCCGCTACAACGACCTGACCCGCCTGATC					
bssyn						
synful.mod						

Фиг. 3

	610	620	630	640	650	660
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCAACTACACCGACCACGCCGTGCGCTGGTACAACACCGGCCTGGAGCGCGTGTGGGGC					
bssyn	T					
synful.mod	T					
	670	680	690	700	710	720
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCGACAGCCGCGACTGGATCCGCTACAACCAGTTCCGCCGCGAGCTGACCCTGACCCGTG					
bssyn	A.G.....					
synful.mod	A.G.....					
	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGACATCGTGAGCCTGTTCCCCAACTACGACAGCCGCACCTACCCCATCCGCACCGTG					
bssyn						
synful.mod						
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCCAGCTGACCCGCGAGATCTACACCAACCCCGTGCTGGAGAACTTCGACGGCAGCTTC					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCAGCGCCCGAGGGCATCGAGGGCAGCATCCGCAGCCCCCACCTGATGGACATCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AACAGCATCACCATCTACACCGACGCCACCGCGCGAGTACTACTGGAGCGGCCACCCAG					
bssyn						
synful.mod						
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATCATGGCCAGCCCCGTGGGCTTCAGCGGCCCCGAGTTACCTTCCCCCTGTACGGCACC					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATGGGCAACGCGCCCCCCCCAGCAGCGCATCGTGGCCAGCTGGGCCAGGGCGTGTACCGC					
bssyn	T..A..T.....A.....A.....					
synful.mod	T..A..T.....A.....A.....					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCCCTGAGCAGCACCCCTGTACCGCGCCCTTCAACATCGGCATCAACAACCAGCAGCTG					
bssyn	T..A..T.....					
synful.mod	T..A..T.....					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCGTGCTGGACGGCACCGAGTTTCGCCTACGGCACCAAGCAGCAACCTGCCCAGCGCCGTG					
bssyn						
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	TACCGCAAGAGCGGCACCGTGGACAGCCTGGACGAGATCCCCCCCCAGAACAACAACGTG					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCCCCCCGCCAGGGCTTCAGCCACCGCCTGAGCCACGTGAGCATGTTCCGCAGCGGCTTC					
bssyn	..A..T..A.....T.....T.....					
synful.mod	..A..T..A.....T.....T.....					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCAACAGCAGCGTGAGCATCATCCGCGCCCCCATGTTTCAGCTGGATCCACCGCAGCGCC					
bssyn	T..A..T.....T.....T...					
synful.mod	T..A..T.....T.....T...					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GAGTTCAACAACATCATCCCCAGCAGCCAGATCACCCAGATCCCCCTGACCAAGAGCACC					
bssyn						
synful.mod						
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AACCTGGGCAGCGGCACCGTGGTGAAGGGCCCCGGCTTCACCGGCGGCACATCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCCGCACCAGCCCCGGCCAGATCAGCACCCCTGC3CGTGAACATCACCGCCCCCTGAGC					
bssyn						
synful.mod						
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CAGCGCTACCGCGTGCGCATCCGCTACGCCAGCACCAACCTGCAGTTCACACCCAGC					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATCGACGGCCGCCCATCAACCAGGGCAACTTCAGCGCCACCATGAGCAGCGGCAGCAAC					
bssyn						
synful.mod						
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGCAGAGCGGCAGCTTCCGCACCGTGGGCTTCACCACCCCCTTCAACTTCAGCAACGGC					
bssyn						
synful.mod						
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCAGCGTGTTCACCCCTGAGCGCCACGTGTTCAACAGCGGCAACGAGGTGTACATCGAC					
bssyn						
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCATCGAGTTCGTGCCCCGCCGAGGTGACCTTCGAGGCCGAGTACGACCTGGAGCGCGCC					
bssyn	A.G..T					
synful.mod	A.G..T					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CAGAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCAACCAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACGTG					
bssyn						
synful.mod						
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCGACTACCACATCGACCAGGTGAGCAACCTGGTGGAGTGCCTGAGCCAGAGTTCTGC					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGACGAGAAGAAGGAGCTGAGCGAGAAGGTGAAGCACGCCAAGCGCCTGAGCGACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCAACCTGCTGCAGGACCCCCAACTTCCGCGGCATCAACCGCCAGCTGGACCGCGGCTGG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCAGCACCGACATCAACATCCAGGGCGGCGACGACGTGTTCAAGGAGAACTACGTG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCCTGCTGGGCACCTTCGACGAGTGCTACCCACCTACCTGTACCAGAAGATCGACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCAAGCTGAAGGCCTACACCCGCTACCAGCTGCGCGGCTACATCGAGGACAGCCAGGAC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGAGATCTACCTGATCCGCTACAACGCCAAGCACGAGACCGTGAACGTGCCCCGGCACC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCAGCCTGTGGCCCCCTGAGCGCCCCCAGCCCCATCGGCAAGTGCGCCCACCACAGCCAC					
bssyn	-----					
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

	2410	2420	2430	2440	2450	2460
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CACTTCAGCCTGGACATCGACGTGGGCTGCACCGACCTGAACGAGGACCTGGGCGTGTGG					
synful.mod	-----					
	2470	2480	2490	2500	2510	2520
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGATCTTCAAGATCAAGACCCAGGACGGCCACGCCCGCCTGGGCAACCTGGAGTTCCTG					
synful.mod	-----					
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGGAGAAGCCCCTGGTGGGCGAGGCCCTGGCCCGCGTGAAGCGCGCCGAGAAGAAGTGG					
synful.mod	-----					
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CGCGACAAGCGCGAGAAGCTGGAGTGGGAGACCAACATCGTGTACAAGGAGGCCAAGGAG					
synful.mod	-----					
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGCGTGGACGCCCTGTTCGTGAACAGCCAGTACGACCGCCTGCAGGCCGACACCAACATC					
synful.mod	-----					
	2710	2720	2730	2740	2750	2760
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GCCATGATCCACGCCCGCGACAAGCGCGTGCACAGCATCCGCGAGGGCTACCTGCCCGAG					
synful.mod	-----					
	2770	2780	2790	2800	2810	2820
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTGAGCGTGATCCCCGGCGTGAACGCCGCCATCTTCGAGGAGCTGGAGGGCCGCATCTTC					
synful.mod	-----					
	2830	2840	2850	2860	2870	2880
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	ACCGCCTTCAGCCTGTACGACGCCCGCAACGTGATCAAGAACGGCGACTTCAACAACGGC					
synful.mod	-----					
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTGAGCTGCTGGAACGTGAAGGGCCACGTGGACGTGGAGGAGCAGAACAACCACCGCAGC					
synful.mod	-----					
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGCTGGTGGTGGCCGAGTGGGAGGCCGAGGTGAGCCAGGAGGTGCGCGTGTGCCCCGGC					
synful.mod	-----					

Фиг. 3 (продолжение)

	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCTACATCCTGCGCGTGACCGCCTACAAGGAGGGCTACGGCGAGGGCTGCGTGACC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATCCACGAGATCGAGAACAACACCGACGAGCTGAAGTTCAGCAACTGCGTGAGGAGGAG					
bssyn	-----					
synful.mod	C.....					
	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GTGTACCCCAACAACACCGTGACCTGCAACGACTACACCGCCACCCAGGAGGAGTACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCACCTACACCAGCCGCAACCGCGGCTACGACGGCGCCTACGAGAGCAACAGCAGCGTG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCGCCGACTACGCCAGCGCCTACGAGGAGAAGGCCTACACCGACGGCCGCGGACAAC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCTGCGAGAGCAACCGCGGCTACGGCGACTACACCCCCCTGCCCGCCGGCTACGTGACC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3370	3380	3390	3400	3410	3420
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AAGGAGCTGGAGTACTTCCCCGAGACCGACAAGGTGTGGATCGAGATCGGCGAGACCGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3430	3440	3450	3460		
	*	*	*	*		
syn1T.mze	GGCACCTTCATCGTGGACAGCGTGGAGCTGCTGCTGATGGAGGAGTAG					
bssyn	-----					
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

	10	20	30	40	50	60
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAAGTAACCCCTGAA					
PMONBT	C.....C..A.....C.....A..C..C..C..G.....A...					
bssyn	C.....C..C.....C..G.....C..C..C..C..CC.G..C.....C..G					
	70	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTCTG					
PMONBT	..T.....C.T.....C.C..T.....C.....T..C.....C..C.....					
bssyn	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCGCTAACGCAATTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGIGCTGGATTGTGTTAGGACTA					
PMONBT	..CT.G..A..G.....GC.C..C..G..C..G..A.....G..C..TC.C.....					
bssyn	AGC..G..C..G..C..GC.....C..G..C..G.....C..C..C..C..C.G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTAACAAT					
PMONBT	C..C..C.....T..C.....A.....T.....C..G..G.....					
bssyn	..G..C..C..C.....C..C..C..C..AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GAACAGTTAATTAACCAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
PMONBT	..G.....G..C.....G..G..C.....G.....C.....G.....C.....G..G					
bssyn	..G..C..G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT					
PMONBT	T.G.....C..C.....C..T.....GAGC..C.....C.....C...					
bssyn	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCC					
PMONBT	C.....TC.CC.C..G..A.....C.....C.....C.....C...					
bssyn	..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C.....C...					
	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CTTACAACCGCTATTCCCTCTTTTGCAGTTCAAAATTATCAAGTTCCCTCTTTTATCAGTA					
PMONBT	T.G..C..A.....C..AT.G..C.....C..G..C..C.....C..G..C..G					
bssyn	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TATGTTCAAGCTGCAAAATTTACATTTATCAGTTTGGAGAGATGTTTCAGTGTTTGGACAA					
PMONBT	..C.....A..T..C.T..CC.CAGC..GC.TC....C...AGC.....G...					
bssyn	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT					
PMONBT	C.....T..A..C.....C.....C..C..CC.T.....G...					
bssyn	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					

Фиг. 4

	610	620	630	640	650	660
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA					
PMONBT	..A.....C..C..C..C.....T..T.....C..T..C..G.....C.....T					
bssyn	C..C..C..C..C..G.....C..C..CC.G.....C..G.....T					
	670	680	690	700	710	720
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA					
PMONBT	..T.....T.....C..C..G..C..G.....G..C..C..A..T					
bssyn	..C..CAGCC.C..C.....C..G..C..C..G..CC.CC.C..GC.G..C..G..C..G					
	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCGAACTATGATAGTAGAACGTATCCAATTGGAACAGTT					
PMONBT	..G..C..T..G.....C..C.....CTCC.....C..C..T..C..T.....G					
bssyn	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
PMONBT	C..T..C.....C.....T.....TC..T..G..C..C..C.....C..C					
bssyn	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..G..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
PMONBT	..T..T..T..C..A..T..C.....CTCC..C.....C.....C.....C..CT.G					
bssyn	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AACAGTATAACCACTCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAAATATTATGGTCAGGGCATCAA					
PMONBT	C.....T.....C..GC.....C.....G.....C.....T..A..C..G					
bssyn	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..C..C..C..AGC..C..C..C					
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCGGGGCCAGAAATTCACCTTTCCGCTATATGGAAC					
PMONBT	..C.....C.....A..T..A..CAGC.....C..G..T..C.....T..C.....					
bssyn	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGA					
PMONBT	C..C.....C.....C.....C.....T..C..C..					
bssyn	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGGATAAATAATCAACAAC					
PMONBT	..C..G..T.....C..G..C.....C..C.....C..T..C..C..C..G.....T					
bssyn	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
PMONBT	..C.....A.....G..C..C.....T..T..C.....T					
bssyn	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C..AG.AGC..CC....CAG...C..G					

Фиг. 4 (продолжение)

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTTCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
bssyn	...G.....C..T....CT....C.....C..A.....C....T...					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGGTTCAGGCTTT					
bssyn	C.....CTCC..CA.G..G....C..G..C.....C.....C..A..C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATACATCGTAGTGCT					
bssyn	..C..C...TCC..G..C..C..C.....A.....T.....					
	1390	1400	1410	1420	1430	
BTHKURHD	*	*	*	*	*	
PMONBT	GAATTTAATAATATAATTCCTTCATCA--CAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTA					
bssyn	..G..C..C.....C.....C..T-.....C..C.....C..A..G..C..G....					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	CTAATCTTGGCTCTGGAACTTCTGTGCTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTC					
bssyn	...C.....A.....G.....C..C.....T.....					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	TTCSAAGAACTTCACCTGCCAGATTTC AACCTTAAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT					
bssyn	..A.....T.....AGC...C.C.....T..C..C.....C.T.					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	CACAAAGATATCGGGTAAGAATTTCGCTACGCTTCTACCACAAATTTACAATTCCATACAT					
bssyn	.T.....T..C..G.....T.....A.....T..C..G.....C..C.					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTA					
bssyn	.C..C.....G.....C.....T..C..C..C.....C...TCA..C..C..C.					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	ATTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATG					
bssyn	.C..G..A.....C.....C..A..C..C.....C.....T..C.....C..T..C.					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PMONBT	GATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG					
bssyn	C..T..C..CC.T..C.....G.....T.....G..C..T.					

RU 2202611 C2

	1800	310	1820	1830	1840
BTHKURHD	*	*	*	*	*
PMONBT	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAAGTAACCTTTGAGGCAGAAATA-----				
bssyn	.C..T.....G.....G..T..C.....T.....C.....T..G..-----				
	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..CGACCTGGAGAGGG				

BTHKURHD	-----
PMONBT	-----
bssyn	CTCAGAAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCAACCAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACG

BTHKURHD	-----T
PMONBT	-----C
bssyn	TGACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG

Фиг. 4 (продолжение)

RU 2202611 C2

	10	20	30	40	50	60
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGACAACAACCCAAACATCAACGAATGCATTCCATACAACCTGCTTGAGTAACCCAGAA	C.....G.....C..C.....C....C....C..G				
	70	80	90	100	110	120
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTTGAAGTACTTGGTGGAGAACGCATTGAAACCGGTTACACTCCCATCGACATCTCCTTG	..G..G..G..G..C..C..G.....C..G.....C.....AG.C..				
	130	140	150	160	170	180
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TCCTTGACACAGTTTCTGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGGTGCTGGGTTCGTTCTCGGACTA	AG.C....C.....C.....G.....C..C..C..C.....G..G..C..G				
	190	200	210	220	230	240
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTTGACATCATCTGGGGTATCTTTGGTCCATCTCAATGGGATGCATTCTCTGGTGCAAATT	..G.....C.....C..C..CAGC..G.....C..C.....G..C				
	250	260	270	280	290	300
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGCAGTTGATCAACCAGAGGATCGAAGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCTCTAGGTTG	C.....C.C.....G.....C.C.....AGCC.CC..				
	310	320	330	340	350	360
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAAGGATTGAGCAATCTCTACCAAATCTATGCAGAGAGCTTCAGAGAGTGGGAAGCCGAT	..G..CC.....C..G.....C..C.....C.C.....G.....C				
	370	380	390	400	410	420
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCTACTAACCCAGCTCTCCGCGAGGAAATGCGTATTCAATTCAACGACATGAACAGCGCC	..C..C.....C..C..G.....G.....C..C..G.....				
	430	440	450	460	470	480
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TTGACCACAGCTATCCCATTGTTGCGCAGTCCAGAACTACCAAGTTCCTCTCTTGTCGGTG	C.....C..C.....CC.....C..G.....G..G..C..GC..AG....				
	490	500	510	520	530	540
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TACGTTCAAGCAGCTAATCTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACGTTAGCGTGTGTTGGGCAA	G..G..C..C..C..G.....G.....G..C.....C.....C..C..G				
	550	560	570	580	590	600
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGGTGGGGATTTCGATGCTGCAACCATCAATAGCCGTTACAAAGACCTTACTAGGCTGATT	C.C.....C.....C..C..C.....C.....C.....G..CC.C.....C				
	610	620	630	640	650	660
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GGAAACTACACCGACCACGCTGTTGTTGGTACAACACTGGCTTGGAGCGTGTCTGGGGT	..C.....C..G..C.....C..C.....C..G.....				
	670	680	690	700	710	720
PMONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCTGATTCTAGAGATTGGATTAGATACAACCAGTTCAGGAGAGAATTGACCCTCACAGTT	..C..CAGCC.C..C.....C..G.....C.CC.C..GC.....G..C..G				

Фиг. 5

	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TTGGACATTGTGTCTCTCTTCCCGAACTATGACTCCAGAACCTACCCTATCCGTACAGTG					
bssyn	C.....C...AGC..G.....C.....C...AG.C.C.....C.....C..C...					
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TCCCAACTTACCAGAGAAATCTATACTAACCCAGTTCTTGAGAACTTCGACGGTAGCTTC					
bssyn	AG...G..G...C.C..G..T..C...C.....C..G..G.....C.....					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CGTGGTTCTGCCCAAGGTATCGAAGGCTCCATCAGGAGCCACACTTGATGGACATCTTG					
bssyn	..C..CAGC.....G..C.....G...AG....C.C.....C...C.....C...					
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AACAGCATAACTATCTACAGCGATGCTCACAGAGGAGAGTATTACTGGTCTGGACACCAG					
bssyn	C..C.....C...C..C...C.C..C.....C.....AGC..C.....					
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ATCATGGCCTCTCCAGTTGGATTTCAGCGGGCCCGAGTTTACCTTTCCTCTCTATGGAAC					
bssyn	AGC..C..C..C.....C.....C.....C...C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ATGGGAAACGCCGCTCCACAACAACGTATCGTTGCTCAACTAGGTCAGGGTGTCTACAGA					
bssyn	C.....T..A..T..G..G..C.....G..A..G..G..C.....A..G..C..C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ACCTTGCTCTCCACCTTGTACAGAAGACCCTTCAATATCGGTATCAACAACCAGCAACTT					
bssyn	...C..AGCAG....C.....C..TC....T.....C.....C.....G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTCGCCTATGGAACCTCTTCTAACTTGCCATCCGCTGTT					
bssyn	AG...G..G.....C..C.....C...C...AGCAGC...C....CAG...C..G					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCCTTGGACGAAATCCCAACACAGAACAAATGTG					
bssyn	...C.C.....C.....G..CAG.C.....G.....C..T.....C...					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CCACCCAGGCAAGGATTCTCCACAGGTTGAGCCACGTGTCCATGTTCCGTTCCGGATTC					
bssyn	TC..A..G..C...AG....C..TC.....AG.....CAGT..C...					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AGCAACAGTTCGGTGAGCATCATCAGAGCTCCTATGTTCTCATGGATTCATCGTAGTGCT					
bssyn	CAG.....C..T..A.....AGC.....C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	GAGTTCAACAATATCATTCCTTCTCCTCTCAAATCACCCAAATCCCATTGACCAAGTCTACT					
bssyn	C.....C...CAG..AGC..G.....G.....CC.....AGC..C					

Фиг. 5 (продолжение)

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AACCTTGGATCTGGAACCTTCTGTCGTGAAAGGACCAGGCTTCACAGGAGGTGATATTCTT					
bssyn	G..CAGC..C..CAGC..G.....G..C..C.....C..C..C..C..G					
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AGAAGAACTTCTCCTGGCCAGATTAGCACCCCTCAGAGTTAACATCACTGCACCACCTTTCT					
bssyn	C.CC.C..CAGC..C.....C.....GC.C..G.....C..C..C..GAGC					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CAAAGATATCGTGTCAAGGATTCGTTACGCATCTACCACTAAGTTGCAATTCCACACCTCC					
bssyn	..GC.C..C..C..C..C..C.....CAGC.....C..C....G.....AG.					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ATCGACGGAAGGCCTATCAATCAGGGTAACTTCTCCGCAACCATGTCAAGCGGCAGCAAC					
bssyn	CC.C..C.....C.....C.....AG...C.....AGC.....					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TTGCAATCCGGCAGCTTCAGAACCGTCGGTTTCACTACTCCTTTCACTTCTCTAACGGA					
bssyn	C....GAG.....C.C.....G..C.....C..C..C.....AGC.....C					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TCAAGCGTTTTTACCCTTAGCGCTCAIGTGTTCAATTCTGGCAATGAAGTGIACATTGAC					
bssyn	AGC.....G.....G.....C..C.....CAGC.....C..G.....C...					
	1810	1820	1830	1840		
	*	*	*	*		
PHONBT	CGIATTGAGTTTGTGCTGCCGAAGTTACCTTCGAGGCTGAGTA-----					
bssyn	..C..C.....C.....C.....G..G.....C.....CGACCTGGAGAGGGCT					
PHONBT	-----					
bssyn	CAGAAGGCCGTGAACGAGCTGTTACACAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACGTC					
PHONBT	-----C					
bssyn	ACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG					

Фиг. 5 (продолжение)

64 ATGGACCTGC TGCCCGACGC CCGCATCGAG GACAGCCTGT GCATCGCCGA GGGCAACAAC
 MetAspLeu LeuProAsp AlaArgIleGlu AspSerLeu CysIleAla GluGlyAsnAsn
 124 ATCGACCCCT TCGTGAGCGC CAGCACCGTG CAGACCGGCA TCAACATCGC CGGCCGCATC
 IleAspPro PheValSer AlaSerThrVal GlnThrGly IleAsnIle AlaGlyArgIle
 184 CTGGGCGTGC TGGGCGTGCC CTTCGCCGGC CAGCTGGCCA GCTTCTACAG CTTCCTGGTG
 LeuGlyVal LeuGlyVal PropheAlaGly GlnLeuAla SerPheTyr SerPheLeuVal
 244 GGCGAGCTGT GGCCCCGCGG CCGCGACCAG TGGGAGATCT TCCTGGAGCA CGTGGAGCAG
 GlyGluLeu TrpProArg GlyArgAspGln TrpGluIle PheLeuGlu HisValGluGln
 304 CTGATCAACC AGCAGATCAC CGAGAACGCC CGCAACACCG CCCTGGCCCG CCTGCAGGGC
 LeuIleAsn GlnGlnIle ThrGluAsnAla ArgAsnThr AlaLeuAla ArgLeuGlnGly
 364 CTGGGCGACA GCTTCCGCGC CTACCAGCAG AGCCTGGAGG ACTGGCTGGA GAACCGCGAC
 LeuGlyAsp SerPheArg AlaTyrGlnGln SerLeuGlu AspTrpLeu GluAsnArgAsp
 424 GACGCCCGCA CCCGCAGCGT GCTGTACACC CAGTACATCG CCCTGGAGCT GGACTTCCTG
 AspAlaArg ThrArgSer ValLeuTyrThr GlnTyrIle AlaLeuGlu LeuAspPheLeu
 484 AACGCCATGC CCCTGTTCGC CATCCGCAAC CAGGAGGTGC CCCTGCTGAT GGTGTACGCC
 AsnAlaMet ProLeuPhe AlaIleArgAsn GlnGluVal ProLeuLeu MetValTyrAla
 544 CAGGCCGCCA ACCTGCACCT GCTGCTGCTG CGCGACGCCA GCCTGTTCGG CAGCGAGTTC
 GlnAlaAla AsnLeuHis LeuLeuLeuLeu ArgAspAla SerLeuPhe GlySerGluPhe
 604 GGCTTGACCA GCCAGGAGAT CCAGCGCTAC TACGAGCGCC AGGTGGAGCG CACCCGCGAC
 GlyLeuThr SerGlnGlu IleGlnArgTyr TyrGluArg GlnValGlu ArgThrArgAsp
 664 TACAGCGACT ACTGCGTGGA GTGGTACAAC ACCGGCCTGA ACAGCCTGCG CGGCACCAAC
 TyrSerAsp TyrCysVal GluTrpTyrAsn ThrGlyLeu AsnSerLeu ArgGlyThrAsn
 724 GCCGCCAGCT GGGTGCGCTA CAACCAGTTC CGCCGCGACC TGACCCTGGG CGTGCTGGAC
 AlaAlaSer TrpValArg TyrAsnGlnPhe ArgArgAsp LeuThrLeu GlyValLeuAsp
 784 CTGGTGGCCC TGTTCGCCAG CTACGACACC CGCACCTACC CCATCAACAC CAGCGCCCAG
 LeuValAla LeuPhePro SerTyrAspThr ArgThrTyr ProIleAsn ThrSerAlaGln
 844 CTGACCCGCG AGGTGTACAC CGACGCCATC GGCGCCACCG GCGTGAACAT GGCCAGCATG
 LeuThrArg GluValTyr ThrAspAlaIle GlyAlaThr GlyValAsn MetAlaSerMet
 904 AACTGGTACA ACAACAACGC CCCCAGCTTC AGCGCCATCG AGGCCGCCGC CATCCGCAGC
 AsnTrpTyr AsnAsnAsn AlaProSerPhe SerAlaIle GluAlaAla AlaIleArgSer
 964 CCCACCTGC TGGACTTCCT GGAGCAGCTG ACCATCTTCA GCGCCAGCAG CCGCTGGAGC
 ProHisLeu LeuAspPhe LeuGluGlnLeu ThrIlePhe SerAlaSer SerArgTrpSer
 1024 AACACCCGCC ACATGACCTA CTGGCGCGGC CACACCATCC AGAGCCGCCC CATCGGCGGC
 AsnThrArg HisMetThr TyrTrpArgGly HisThrIle GlnSerArg ProIleGlyGly

Фиг. 6

1084 GGCCTGAACA CCAGCACCCA CGGCGCCACC AACACCAGCA TCAACCCCGT GACCCTGCGC
GlyLeuAsn ThrSerThr HisGlyAlaThr AsnThrSer IleAsnPro ValThrLeuArg

1144 TTCGCCAGCC GCGACGTGTA CCGCACCGAG AGCTACGCCG GCGTGCTGCT GTGGGGCATC
PheAlaSer ArgAspVal TyrArgThrGlu SerTyrAla GlyValLeu LeuTrpGlyIle

1204 TACCTGGAGC CCATCCACGG CGTGCCCAACC GTGCGCTTCA ACTTCACCAA CCCCCAGAAC
TyrLeuGlu ProIleHis GlyValProThr ValArgPhe AsnPheThr AsnProGlnAsn

1264 ATCAGCGACC GCGGCACCGC CAACTACAGC CAGCCCTACG AGAGCCCCGG CCTGCAGCTG
IleSerAsp ArgGlyThr AlaAsnTyrSer GlnProTyr GluSerPro GlyLeuGlnLeu

1324 AAGGACAGCG AGACCGAGCT GCGCCCCGAG ACCACCGAGC GCGCCAACTA CGAGAGCTAC
LysAspSer GluThrGlu LeuProProGlu ThrThrGlu ArgProAsn TyrGluSerTyr

1384 AGCCACCGCC TGAGCCACAT CGGCATCATC CTGCAGAGCC GCGTGAACGT GCGCGTGAC
SerHisArg LeuSerHis IleGlyIleIle LeuGlnSer ArgValAsn ValProValTyr

1444 AGCTGGACCC ACCGCAGCGC CGACCGCACC AACACCATCG GCGCCAAACCG CATCACCCAG
SerTrpThr HisArgSer AlaAspArgThr AsnThrIle GlyProAsn ArgIleThrGln

1504 ATCCCCATGG TGAAGGCCAG CGAGCTGCCC CAGGGCACCA CCGTGGTGGC CGGCCCCGGC
IleProMet ValLysAla SerGluLeuPro GlnGlyThr ThrValVal ArgGlyProGly

1564 TTCACCGGCG GCGACATCCT GCGCCGCACC AACACCGGCG GCTTCGGCCC CATCCGCGTG
PheThrGly GlyAspIle LeuArgArgThr AsnThrGly GlyPheGly ProIleArgVal

1624 ACCGTGAACG GCGCCCTGAC CCAGCGCTAC CGCATCGGCT TCCGCTACGC CAGCACCGTG
ThrValAsn GlyProLeu ThrGlnArgTyr ArgIleGly PheArgTyr AlaSerThrVal

1684 GACTTCGACT TCTTCGTGAG CCGCGGCGGC ACCACCGTGA ACAACTTCCG CTTCTGCGC
AspPheAsp PhePheVal SerArgGlyGly ThrThrVal AsnAsnPhe ArgPheLeuArg

1744 ACCATGAACA GCGGCGACGA GCTGAAGTAC GGCAACTTCG TGCGCCGCGC CTTACCAACC
ThrMetAsn SerGlyAsp GluLeuLysTyr GlyAsnPhe ValArgArg AlaPheThrThr

1804 CCCTTCACCT TCACCCAGAT CCAGGACATC ATCCGCACCA GCATCCAGGG CCTGAGCGGC
ProPheThr PheThrGln IleGlnAspIle IleArgThr SerIleGln GlyLeuSerGly

1864 AACGGCGAGG TGTACATCGA CAAGATCGAG ATCATCCCCG TGACCGCCAC CTTGAGGGC
AsnGlyGlu ValTyrIle AspLysIleGlu IleIlePro ValThrAla ThrPheGluAla

1924 GAGTACGACC TGGAGCGCGC CCAGGAGGCC GTGAACGCCC TGTTCACCAA CACCAACCCC
GluTyrAsp LeuGluArg AlaGlnGluAla ValAsnAla LeuPheThr AsnThrAsnPro

1984 CGCCGCCTGA AGACCGACGT GACCGACTAC CACATCGACC AGGTGAGCAA CCTGGTGGCC
ArgArgLeu LysThrAsp ValThrAspTyr HisIleAsp GlnValSer AsnLeuValAla

2044 TGCCTGAGCG ACGAGTTCTG CCTGGACGAG AAGCGCGAGC TGCTGGAGAA GGTGAAGTAC
CysLeuSer AspGluPhe CysLeuAspGlu LysArgGlu LeuLeuGlu LysValLysTyr

Фиг. 6 (продолжение)

2104 GCCAAGCGCC TGAGCGACGA GCGCAACCTG CTGCAGGACC CCAACTTCAC CAGCATCAAC
 AlaLysArg LeuSerAsp GluArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPhe ThrSerIleAsn
 2164 AAGCAGCCCG ACTTCATCAG CACCAACGAG CAGAGCAACT TCACCAGCAT CCACGAGCAG
 LysGlnPro AspPheIle SerThrAsnGlu GlnSerAsn PheThrSer IleHisGluGln
 2224 AGCGAGCACG GCTGGTGGGG CAGCGAGAAC ATCACCATCC AGGAGGGCAA CGACGTGTTC
 SerGluHis GlyTrpTrp GlySerGluAsn IleThrIle GlnGluGly AsnAspValPhe
 2284 AAGGAGAACT ACGTGACCCT GCCCGGCACC TTCAACGAGT GCTACCCAC CTACCTGTAC
 LysGluAsn TyrValThr LeuProGlyThr PheAsnGlu CysTyrPro ThrTyrLeuTyr
 2344 CAGAAGATCG GCGAGAGCGA GCTGAAGGCC TACACCCGCT ACCAGCTGCG CGGCTACATC
 GlnLysIle GlyGluSer GluLeuLysAla TyrThrArg TyrGlnLeu ArgGlyTyrIle
 2404 GAGGACAGCC AGGACCTGGA GATCTACCTG ATCCGCTACA ACGCCAAGCA CGAGACCCTG
 GluAspSer GlnAspLeu GluIleTyrLeu IleArgTyr AsnAlaLys HisGluThrLeu
 2464 GACGTGCCCC GCACCGAGAG CCTGTGGCCC CTGAGCGTGG AGAGCCCCAT CGGCCGCTGC
 AspValPro GlyThrGlu SerLeuTrpPro LeuSerVal GluSerPro IleGlyArgCys
 2524 GGCGAGCCCA ACCGCTGCGC CCCCCACTTC GAGTGGAACC CCGACCTGGA CTGCAGCTGC
 GlyGluPro AsnArgCys AlaProHisPhe GluTrpAsn ProAspLeu AspCysSerCys
 2584 CGCGACGGCG AGAAGTGCGC CCACCACAGC CACCACTTCA GCCTGGACAT CGACGTGGGC
 ArgAspGly GluLysCys AlaHisHisSer HisHisPhe SerLeuAsp IleAspValGly
 2644 TGCACCGACC TGCACGAGAA CCTGGGCGTG TGGGTGGTGT TCAAGATCAA GACCCAGGAG
 CysThrAsp LeuHisGlu AsnLeuGlyVal TrpValVal PheLysIle LysThrGlnGlu
 2704 GGCCACGCCC GCCTGGGCAA CCTGGAGTTC ATCGAGGAGA AGCCCCTGCT GGGCGAGGCC
 GlyHisAla ArgLeuGly AsnLeuGluPhe IleGluGlu LysProLeu LeuGlyGluAla
 2764 CTGAGCCGCG TGAAGCGCGC CGAGAAGAAG TGGCGCGACA AGCGCGAGAA GCTGCAGCTG
 LeuSerArg ValLysArg AlaGluLysLys TrpArgAsp LysArgGlu LysLeuGlnLeu
 2824 GAGACCAAGC GCGTGACAC CGAGGCCAAG GAGGCCGTGG ACGCCCTGTT CGTGGACAGC
 GluThrLys ArgValTyr ThrGluAlaLys GluAlaVal AspAlaLeu PheValAspSer
 2884 CAGTACGACC GCCTGCAGGC CGACACCAAC ATCGGCATGA TCCACGCCGC CGACAAGCTG
 GlnTyrAsp ArgLeuGln AlaAspThrAsn IleGlyMet IleHisAla AlaAspLysLeu
 2944 GTGCACCGCA TCCGCGAGGC CTACCTGAGC GAGCTGCCCC TGATCCCCCG CGTGAACGCC
 ValHisArg IleArgGlu AlaTyrLeuSer GluLeuPro ValIlePro GlyValAsnAla
 3004 GAGATCTTCG AGGAGCTGGA GGGCCACATC ATCACCGCCA TCAGCCTGTA CGACGCCCGC
 GluIlePhe GluGluLeu GluGlyHisIle IleThrAla IleSerLeu TyrAspAlaArg

Фиг. 6 (продолжение)

3064 AACGTGGTGA AGAACGGCGA CTTCAACAAC GGCCTGACCT GCTGGAACGT GAAGGGCCAC
 AsnValVal LysAsnGly AspPheAsnAsn GlyLeuThr CysTrpAsn ValLysGlyHis
 3124 GTGGACGTGC AGCAGAGCCA CCACCGCAGC GACCTGGTGA TCCCCGAGTG GGAGGCCGAG
 ValAspVal GlnGlnSer HisHisArgSer AspLeuVal IleProGlu TrpGluAlaGlu
 3184 GTGAGCCAGG CCGTGCGCGT GTGCCCCGGC TCGGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC
 ValSerGln AlaValArg ValCysProGly CysGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr
 3244 AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG
 LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu
 3304 CTGAAGTTCA AGAACCGCGA GGAGGAGGAG GTGTACCCCA CCGACACCGG CACCTGCAAC
 LeuLysPhe LysAsnArg GluGluGluGlu ValTyrPro ThrAspThr GlyThrCysAsn
 3364 GACTACACCG CCCACCAGGG CACCGCCGGC TCGCCGACG CCTGCAACAG CCGCAACGCC
 AspTyrThr AlaHisGln GlyThrAlaGly CysAlaAsp AlaCysAsn SerArgAsnAla
 3424 GGCTACGAGG ACGCCTACGA GGTGGACACC ACCGCCAGCG TGAATAACAA GCCCACCTAC
 GlyTyrGlu AspAlaTyr GluValAspThr ThrAlaSer ValAsnTyr LysProThrTyr
 3484 GAGGAGGAGA CCTACACCGA CGTGCGCCGC GACAACCACT GCGAGTACGA CCGCGGCTAC
 GluGluGlu ThrTyrThr AspValArgArg AspAsnHis CysGluTyr AspArgGlyTyr
 3544 GTGAACTACC CCCCCGTGCC CGCCGGCTAC GTGACCAAGG AGCTGGAGTA CTTCCCCGAG
 ValAsnTyr ProProVal ProAlaGlyTyr ValThrLys GluLeuGlu TyrPheProGlu
 3604 ACCGACACCG TGTGGATCGA GATCGGCGAG ACCGAGGGCA AGTTCATCGT GGACAGCGTG
 ThrAspThr ValTrpIle GluIleGlyGlu ThrGluGly LysPheIle ValAspSerVal
 64 GAGCTGCTGC TGATGGAGGA GTAG
 GluLeuLeu LeuMetGlu Glu---

Фиг. 6 (продолжение)

ПОЛНОЙ ДЛИНЫ ГИБРИДНАЯ СИНТЕТИЧЕСКАЯ /НАТИВНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Cγ1A/b/ ХИМЕРНОГО ГЕНА

Точка слияния синтетической и нативной кодирующей последовательности указана в последовательности наклонной чертой (/).

```

1  ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
   MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61  GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
   ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
   SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
   ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
   GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
   GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
   ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCTT GCTGAGCGTG
   LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
   TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
   ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
   GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
   ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
   LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
   SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
   ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
   AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

```

Фиг. 7

961 ATCATGGCCA GCCCGTCGG CTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCA CCGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCGGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

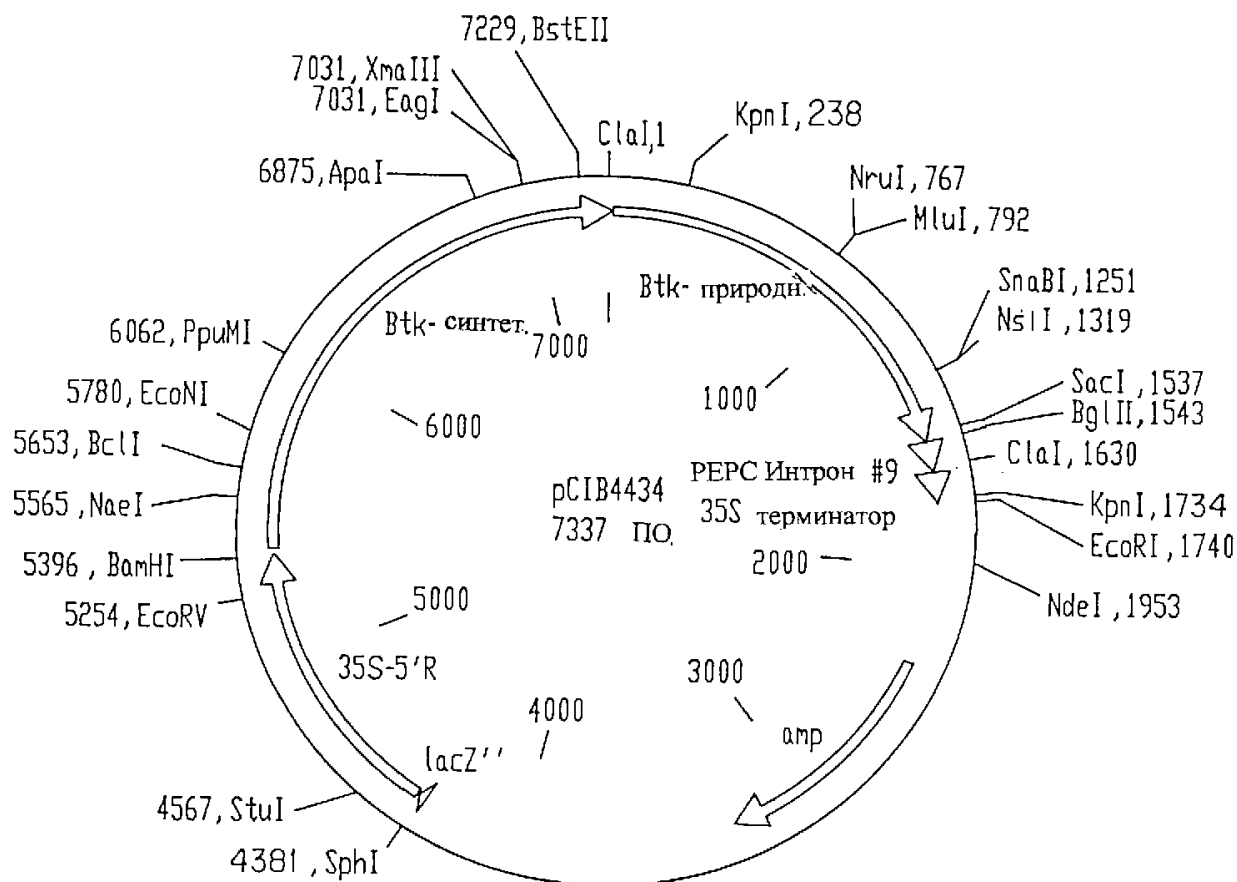
Фиг. 7 (продолжение)

1921 ACCGACTACC ACATCGAT/CA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGATGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp/GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGCCCA TCATTCCCAT
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysAla HisHisSerHis
 2401 CATTTCTCCT TGGACATTGA TGTTGGATGT ACAGACTTAA ATGAGGACTT AGGTGTATGG
 HisPheSer LeuAspIle AspValGlyCys ThrAspLeu AsnGluAsp LeuGlyValTrp
 2461 GTGATATTCA AGATTAAGAC GCAAGATGGC CATGCAAGAC TAGGAAATCT AGAATTTCTC
 ValIlePhe LysIleLys ThrGlnAspGly HisAlaArg LeuGlyAsn LeuGluPheLeu
 2521 GAAGAGAAAC CATTAGTAGG AGAAGCACTA GCTCGTGTGA AAAGAGCGGA GAAAAAATGG
 GluGluLys ProLeuVal GlyGluAlaLeu AlaArgVal LysArgAla GluLysLysTrp
 2581 AGAGACAAAC GTGAAAAATT GGAATGGGAA ACAAATATTG TTTATAAAGA GGCAAAAGAA
 ArgAspLys ArgGluLys LeuGluTrpGlu ThrAsnIle ValTyrLys GluAlaLysGlu
 2641 TCTGTAGATG CTTTATTTGT AAACCTCTCAA TATGATAGAT TACAAGCGGA TACCAACATC
 SerValAsp AlaLeuPhe ValAsnSerGln TyrAspArg LeuGlnAla AspThrAsnIle
 2701 GCGATGATTC ATGCGGCAGA TAAACGCGTT CATAGCATTG GAGAAGCTTA TCTGCCTGAG
 AlaMetIle HisAlaAla AspLysArgVal HisSerIle ArgGluAla TyrLeuProGlu
 2761 CTGTCTGTGA TTCCGGGTGT CAATGCGGCT ATTTTGAAG AATTAGAAGG GCGTATTTTC
 LeuSerVal IleProGly ValAsnAlaAla IlePheGlu GluLeuGlu GlyArgIlePhe
 2821 ACTGCATTCT CCCTATATGA TCGAGAAAAT GTCATTAAAA ATGGTGATTT TAATAATGGC
 ThrAlaPhe SerLeuTyr AspAlaArgAsn ValIleLys AsnGlyAsp PheAsnAsnGly

Фиг. 7 (продолжение)

2881	TTATCCTGCT GGAACGTGAA AGGGCATGTA	GATGTAGAAG AACAAAAACAA CCACCGTTCG
	LeuSerCys TrpAsnVal LysGlyHisVal	AspValGlu GluGlnAsn AsnHisArgSer
2941	GTCCTTGTTG TTCCGGAATG GGAAGCAGAA	GTGTCACAAG AAGTTCGTGT CTGTCCGGGT
	ValLeuVal ValProGlu TrpGluAlaGlu	ValSerGln GluValArg ValCysProGly
3001	CGTGGCTATA TCCTTCGTGT CACAGCGTAC	AAGGAGGGAT ATGGAGAAGG TTGCGTAACC
	ArgGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr	LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr
3061	ATTCATGAGA TCGAGAACAA TACAGACGAA	CTGAAGTTTA GCAACTGTGT AGAAGAGGAA
	IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu	LeuLysPhe SerAsnCys ValGluGluGlu
3121	GTATATCCAA ACAACACGGT AACGTGTAAT	GATTATACTG CGACTCAAGA AGAATATGAG
	ValTyrPro AsnAsnThr ValThrCysAsn	AspTyrThr AlaThrGln GluGluTyrGlu
3181	GGTACGTACA CTTCTCGTAA TCGAGGATAT	GACGGAGCCT ATGAAAGCAA TTCTTCTGTA
	GlyThrTyr ThrSerArg AsnArgGlyTyr	AspGlyAla TyrGluSer AsnSerSerVal
3241	CCAGCTGATT ATGCATCAGC CTATGAAGAA	AAAGCATATA CAGATGGACG AAGAGACAAT
	ProAlaAsp TyrAlaSer AlaTyrGluGlu	LysAlaTyr ThrAspGly ArgArgAspAsn
3301	CCTTGTGAAT CTAACAGAGG ATATGGGGAT	TACACACCAC TACCAGCTGG CTATGTGACA
	ProCysGlu SerAsnArg GlyTyrGlyAsp	TyrThrPro LeuProAla GlyTyrValThr
3361	AAAGAATTAG AGTACTTCCC AGAAACCGAT	AAGGTATGGA TTGAGATCGG AGAAACGGAA
	LysGluLeu GluTyrPhe ProGluThrAsp	LysValTrp IleGluIle GlyGluThrGlu
3421	GGAACATTCA TCGTGGACAG CGTGGAATTA	CTTCTTATGG AGGAATAA
	GlyThrPhe IleValAsp SerValGluLeu	LeuLeuMet GluGlu---

Фиг. 7 (продолжение)



1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTACGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

Фиг. 9

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg

1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu

1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal

1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe

1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla

1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr

1441 AACCTGGGCA GCGGCACCGA CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu

1501 CGCCGCACCA GCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer

1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer

1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn

1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly

1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp

1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla

1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys VallysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

Фиг. 9 (продолжение)

2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTC
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGCAGCCTGT GGGCCCTGAG CGCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TGCCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTACGCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAAGAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

Фиг. 9 (продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATA
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACCT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

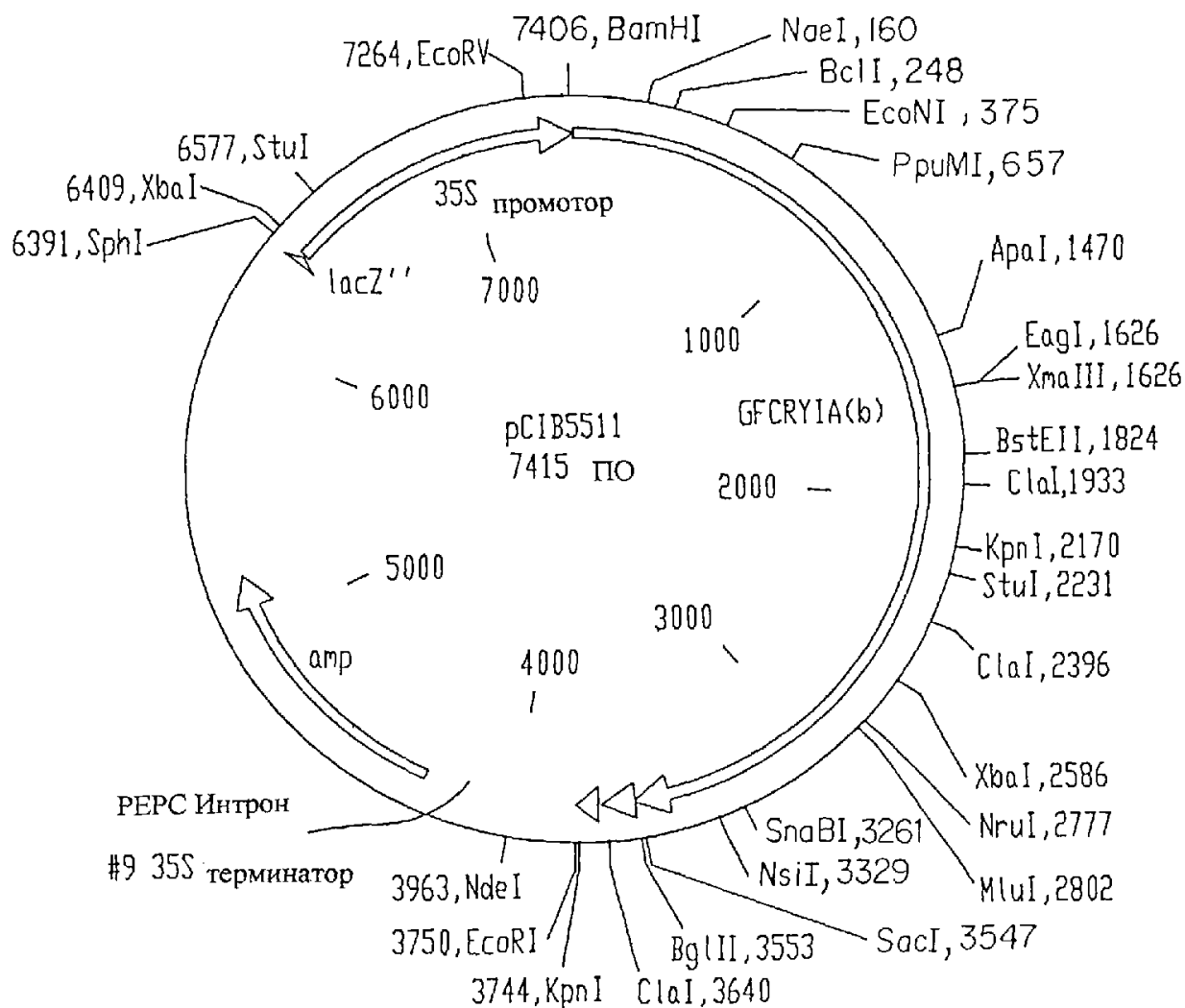
3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACCA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTCATC GTGGACAGCG TGGAATTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAA
Glu---

Фиг. 9 (продолжение)



Фиг. 10

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCI
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

Фиг. 11

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg

1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu

1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal

1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe

1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla

1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr

1441 AACCTGGGCA GCGGCACCGA CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu

1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer

1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer

1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn

1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly

1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp

1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla

1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCACG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

Фиг. 11 (продолжение)

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GCGGACGACG TGTTCAGGA GAACTACGTG
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGCAGCCTGT GGGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TCGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTACGCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2541 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGATAGTGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

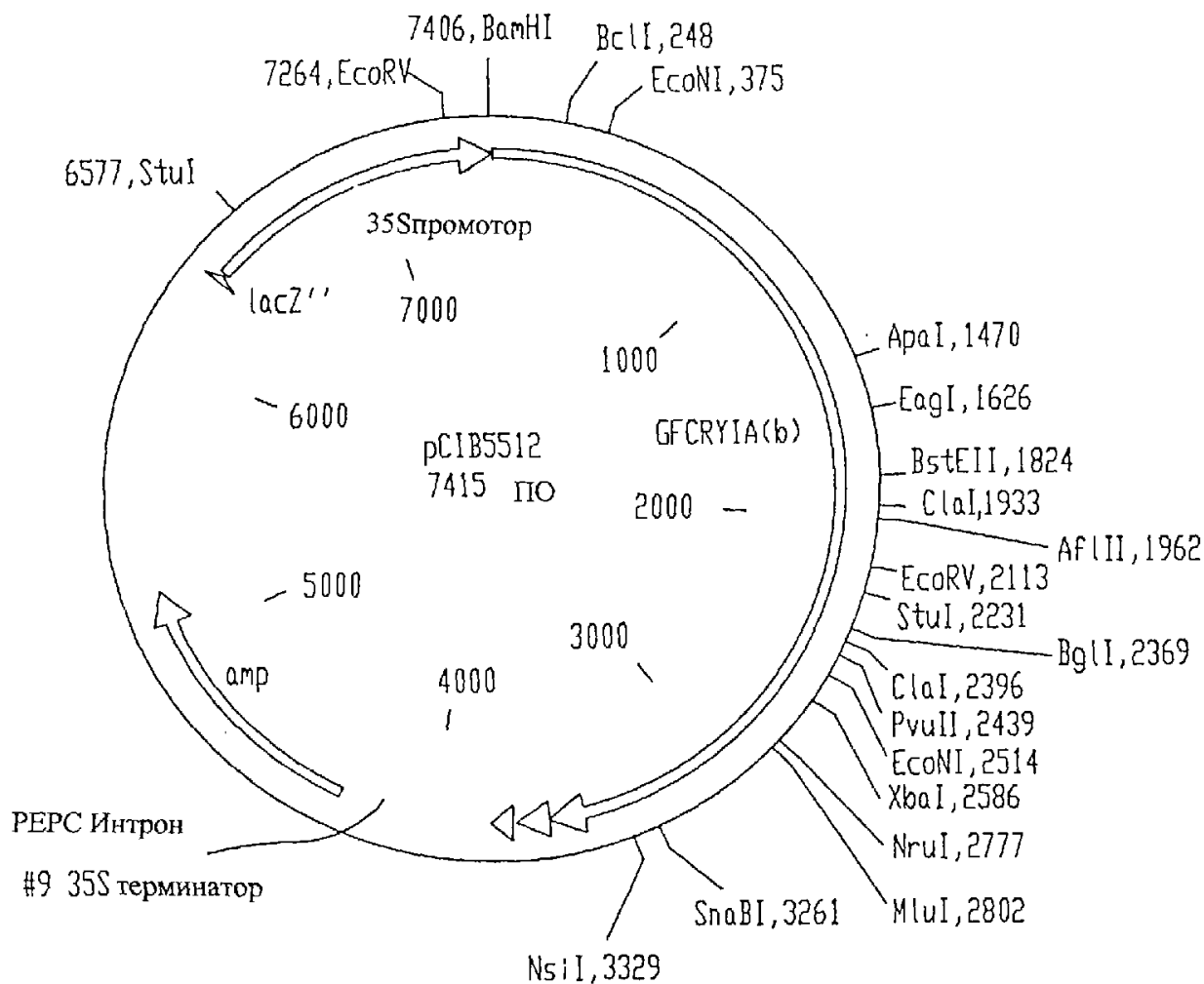
2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

Фиг. 11 (продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTTCATC GTGGACAGCG TGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---

Фиг. 11 (продолжение)



Фиг. 12

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCCG GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

Фиг. 13

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTS
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1351 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCACG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

Фиг. 13 (продолжение)

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GGCAGCAGC TGTTCAAGGA GAACTACGTG
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGCAGCCTGT GGGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTACGCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AGTTCCTGGA GGAGAAGCCC CTGGTGGGCG AGGCCCTGGC CCGCGTGAAG
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 CGCGCCGAGA AGAAGTGGCG CGACAAGCGC GAGAAGCTGG AGTGGGAGAC CAACATCGTG
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TACAAGGAGG CCAAGGAGAG CGTGGACGCC CTGTTCGTGA ACAGCCAGTA CGACCGCCTG
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAGGCCGACA CCAACATCGC CATGATCCAC GCGCCGACA AGCGCGTGCA CAGCATTCGC
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAGGCCTACC TGCCCGAGCT GAGCGTGATC CCCGGCGTGA ACGCCGCCAT CTTGAGGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 CTCGAGGGCC GCATCTTAC CGCCTTCAGC CTGTACGACG CCCGCAACGT GATCAAGAAC
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGCGACTTCA ACAACGGCCT GAGCTGCTGG AACGTGAAGG GCCACGTGGA CGTGGAGGAG
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAGAACAACC ACCGCAGCGT GCTGGTGGTG CCCGAGTGGG AGGCCGAGGT GAGCCAGGAG
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

Фиг. 13 (продолжение)

3061 GTGCGCGTGT GCCCCGGCCG CGGCTACATC CTGCGCGTGA CCGCCTACAA GGAGGGCTAC
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGCGAGGGCT GCGTGACCAT CCACGAGATC GAGAACAACA CCGACGAGCT CAAGTTCAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGCGTGG AGGAGGAGGT GTACCCCAAC AACACCGTGA CCTGCAACGA CTACACCGCG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACCCAGGAGG AGTACGAGGG CACCTACACC AGCCGCAACC GCGGCTACGA CGGCGCCTAC
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAGAGCAACA GCAGCGTGCC CGCCGACTAC GCCAGCGCCT ACGAGGAGAA GGCCTACACC
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

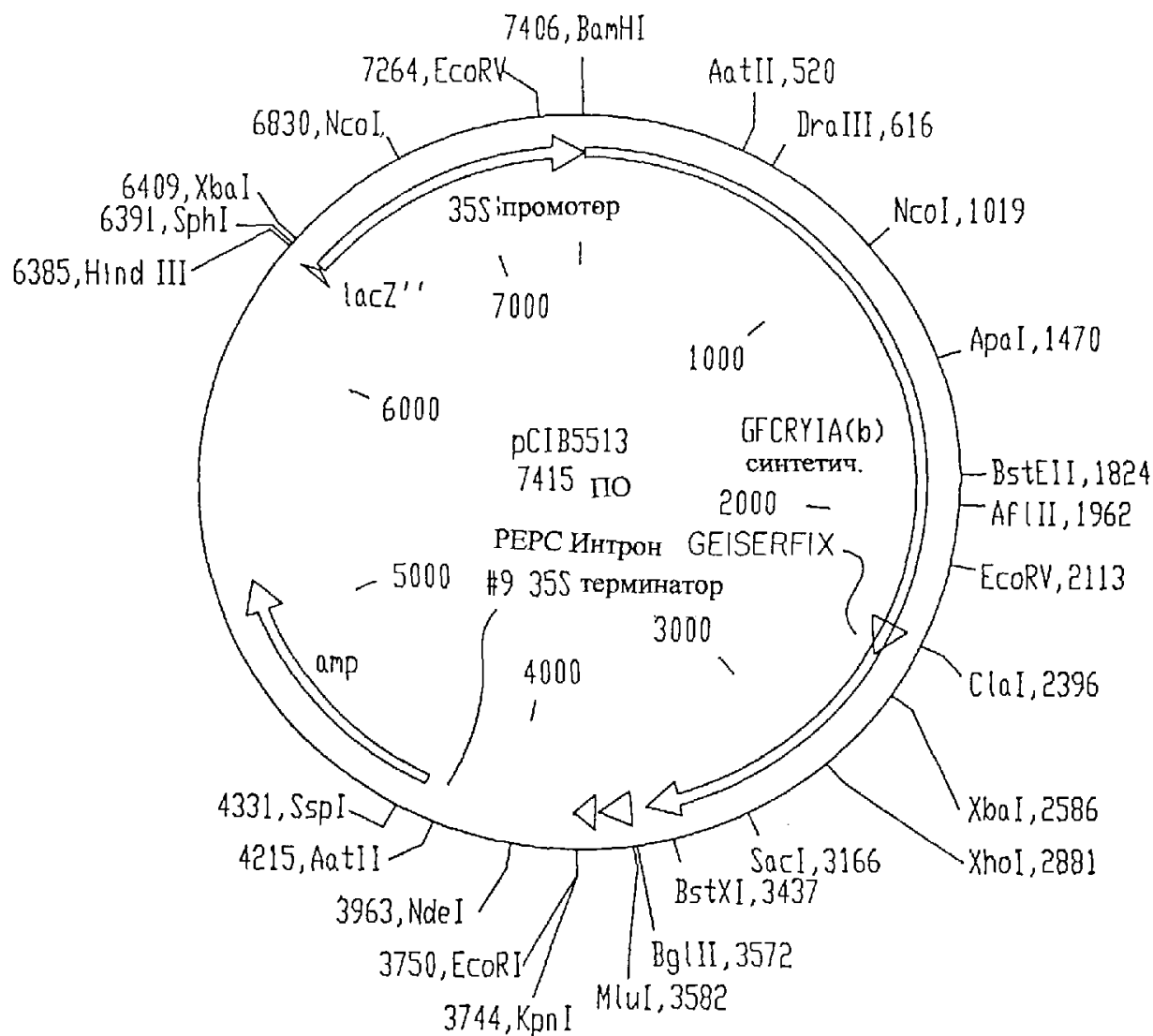
3361 GACGGCCGCC GCGACAACCC CTGCGAGAGC AACCGCGGCT ACGGCGACTA CACCCCCCTG
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCCGCCGGCT ACGTGACCAA GGAGCTGGAG TACTTCCCCG AGACCGACAA GGTGTGGATC
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGCG AGACCGAGGG CACCTTCATC GTGGACAGCG TGGAGCTGCT GCTGATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAGTAG
Glu---

Фиг. 13 (продолжение)



Фиг. 14

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCGT
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCGT
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATG
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCGAGC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTACGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

Фиг. 15

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGG
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg

1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu

1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal

1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe

1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla

1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr

1441 AACCTGGGCA GCGGCACCA CCGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu

1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATACCCGC CCCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer

1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer

1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn

1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly

1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp

1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla

1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGATGAAA AAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

Фиг. 15 (продолжение)

2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GCGGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGCA AGTGCAGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TCGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTACGCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCGA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

Фиг. 15 (продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCC
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

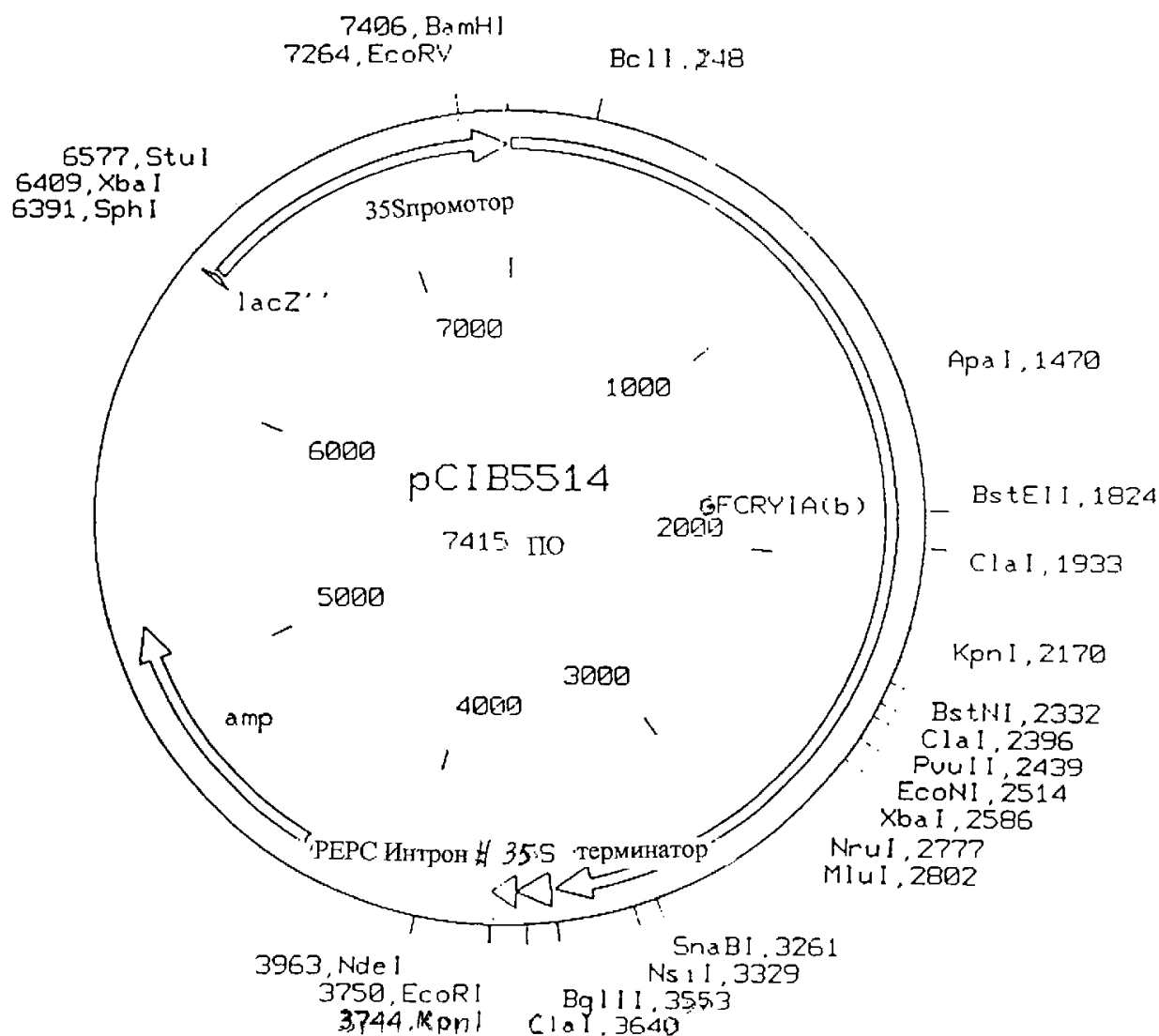
3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGAAT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

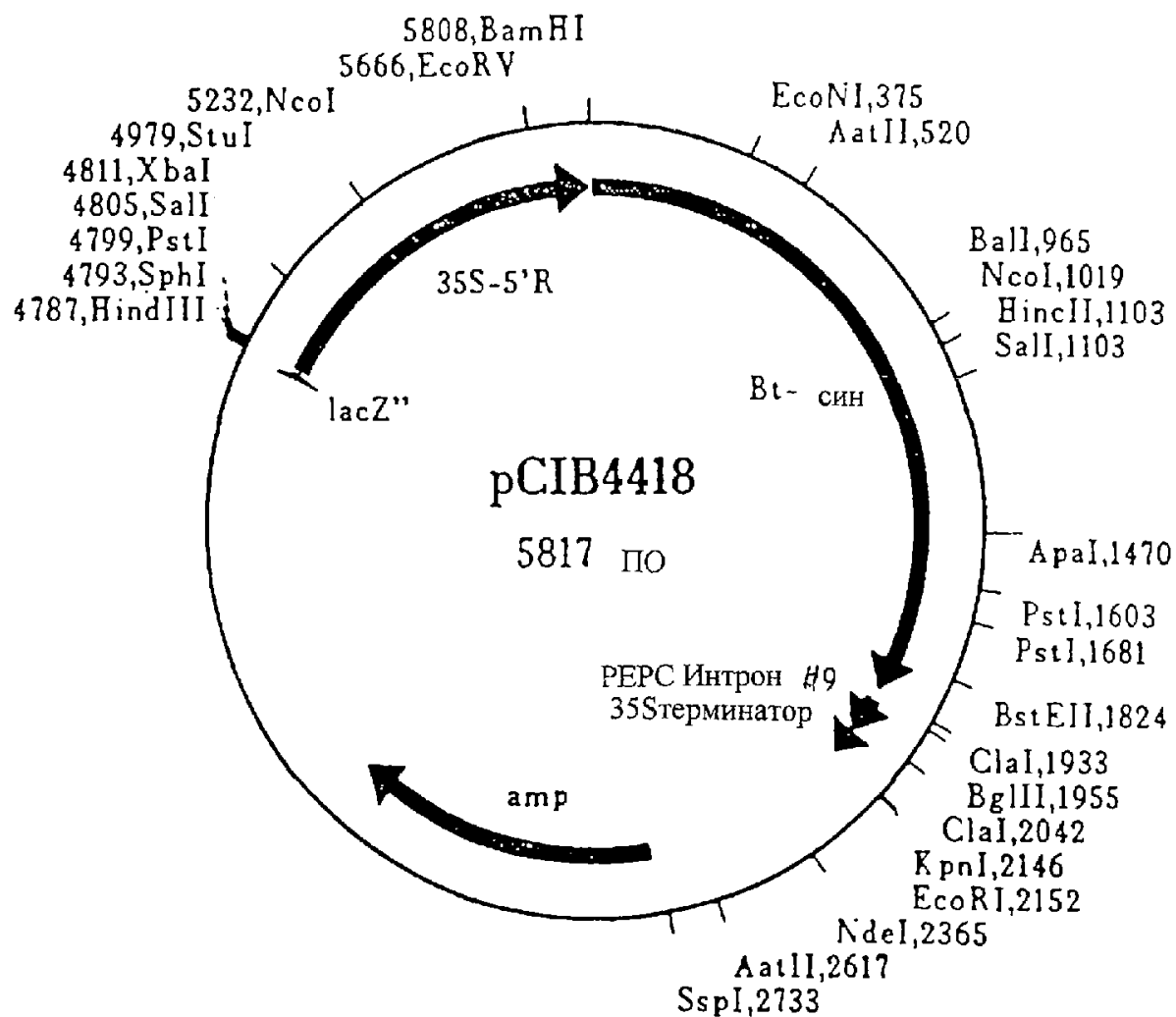
3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTCATC GTGGACAGCG TGGAACTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAAG
Glu---

Фиг. 15 (продолжение)

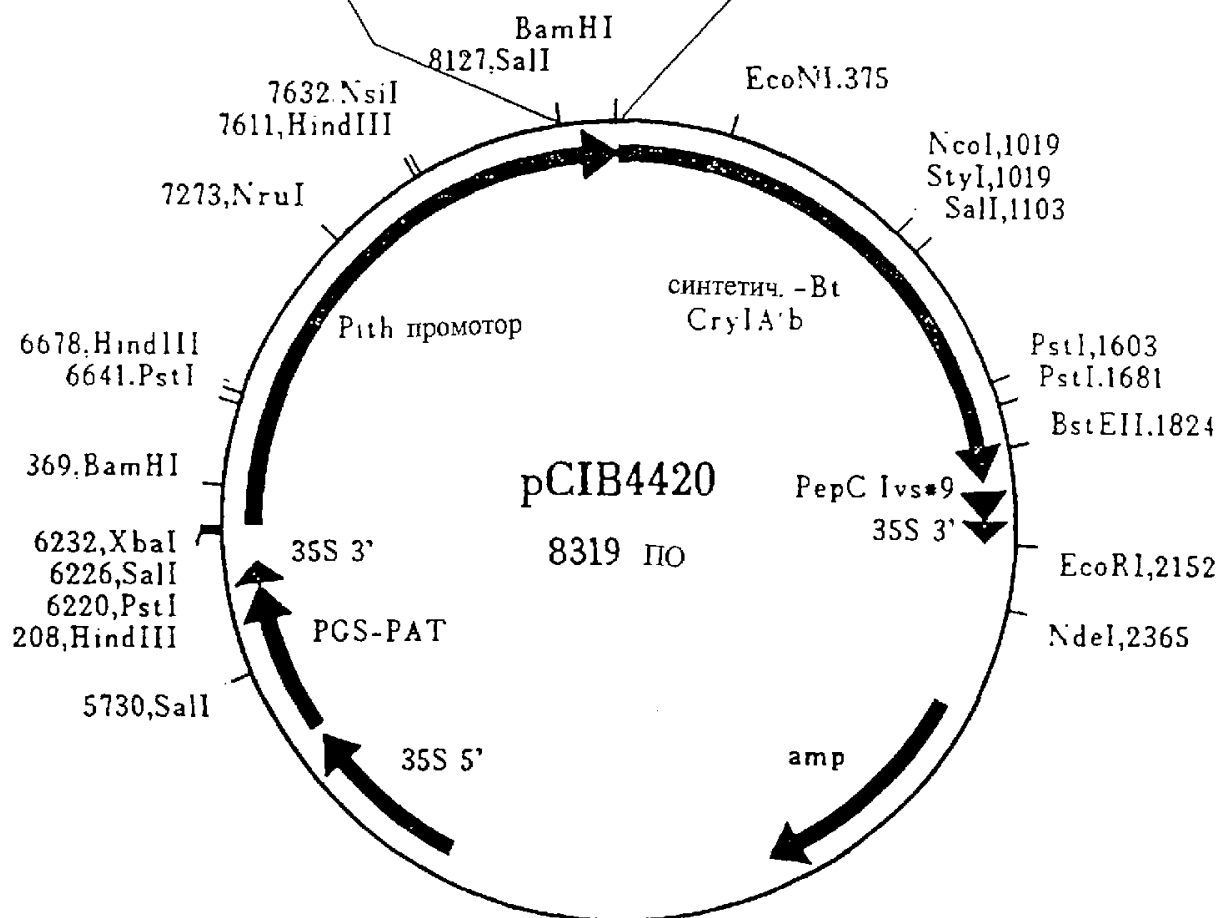


Фиг. 16

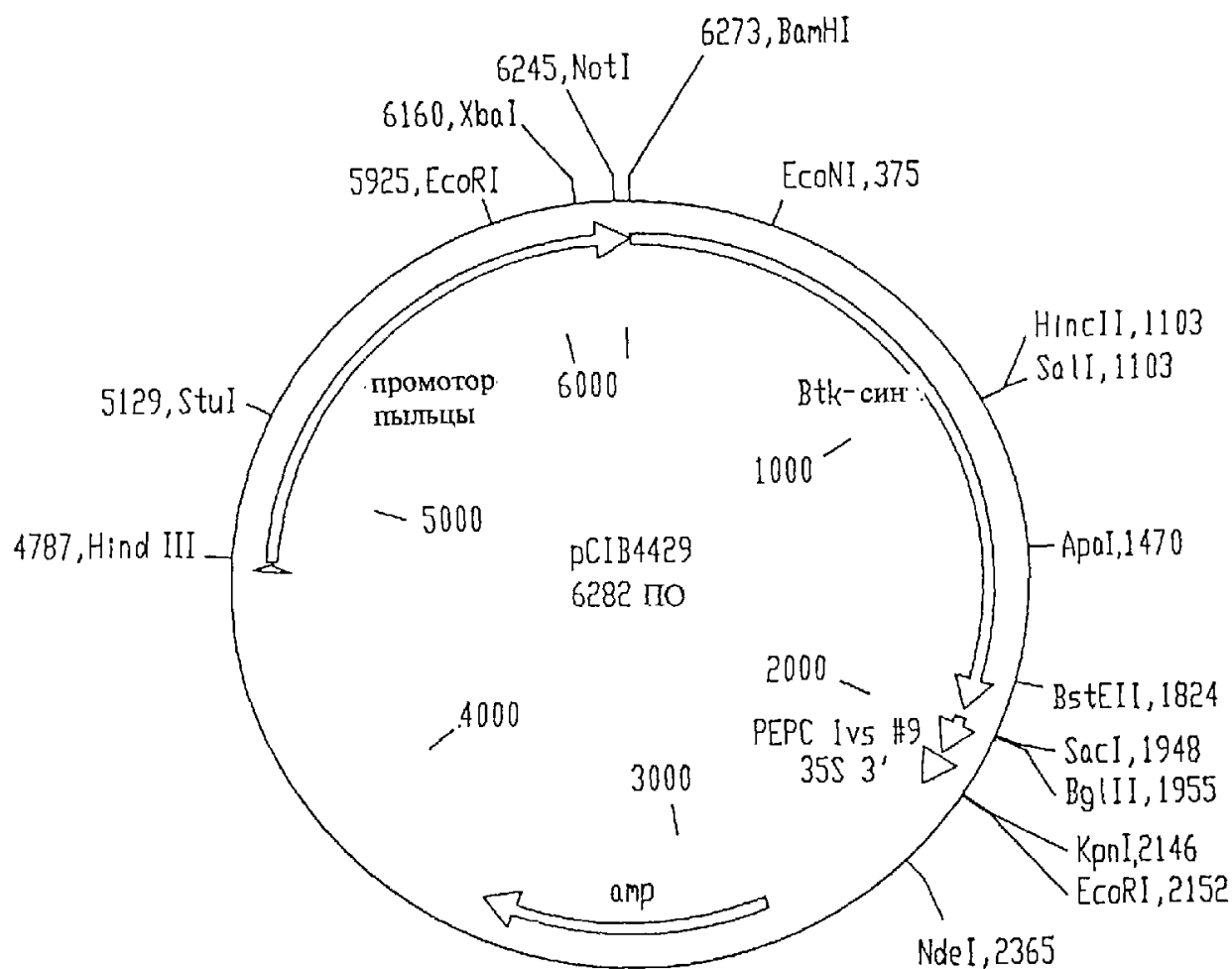


Фиг. 17

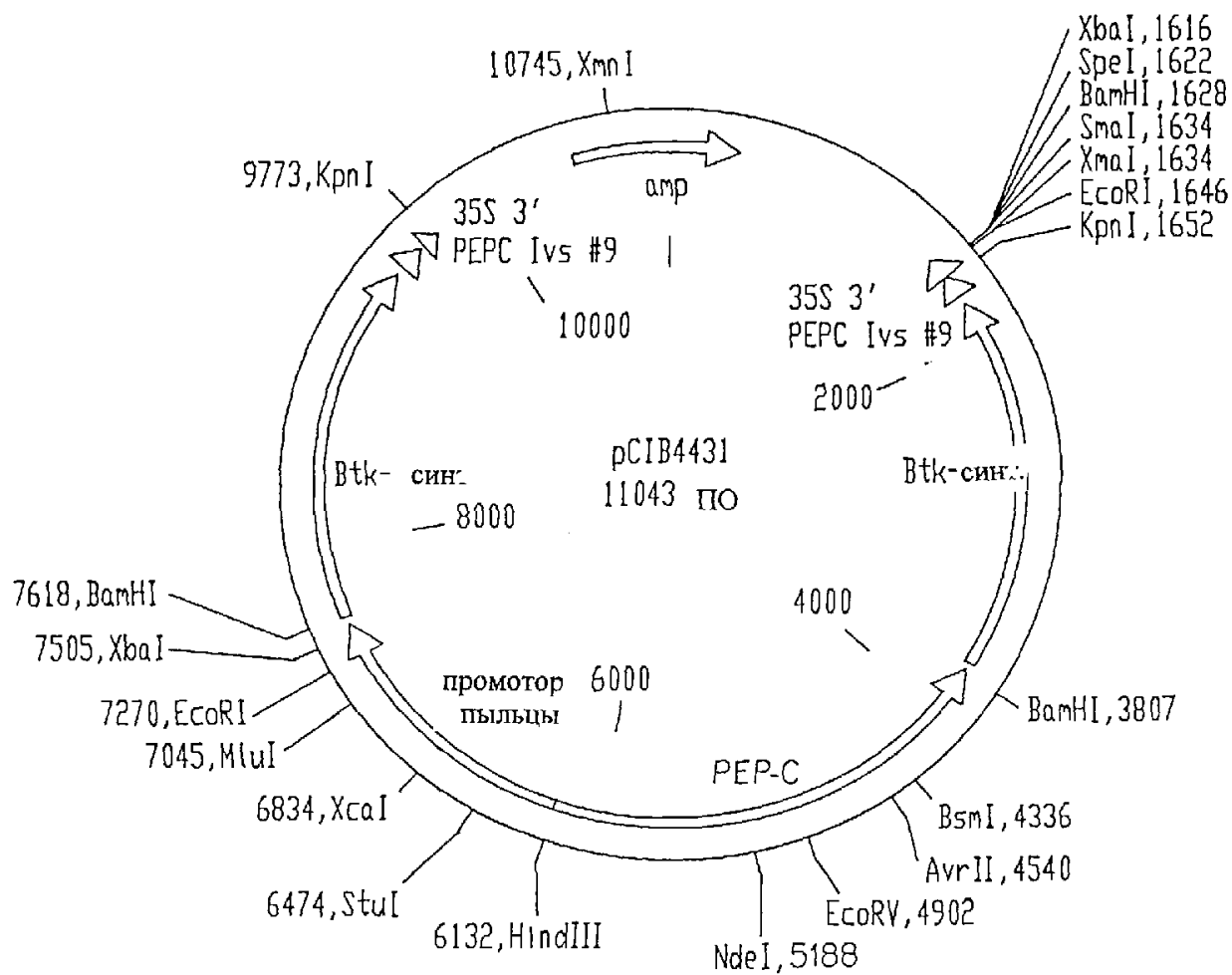
ПСР ФРАГМЕНТ, ЗАМЕНИВШИЙ Pith Nco I (АТГ СТАРТ)
 НА. Bam HI. Pith-5'-GGATCCAACA(АТГ)-3'-син.-Bt



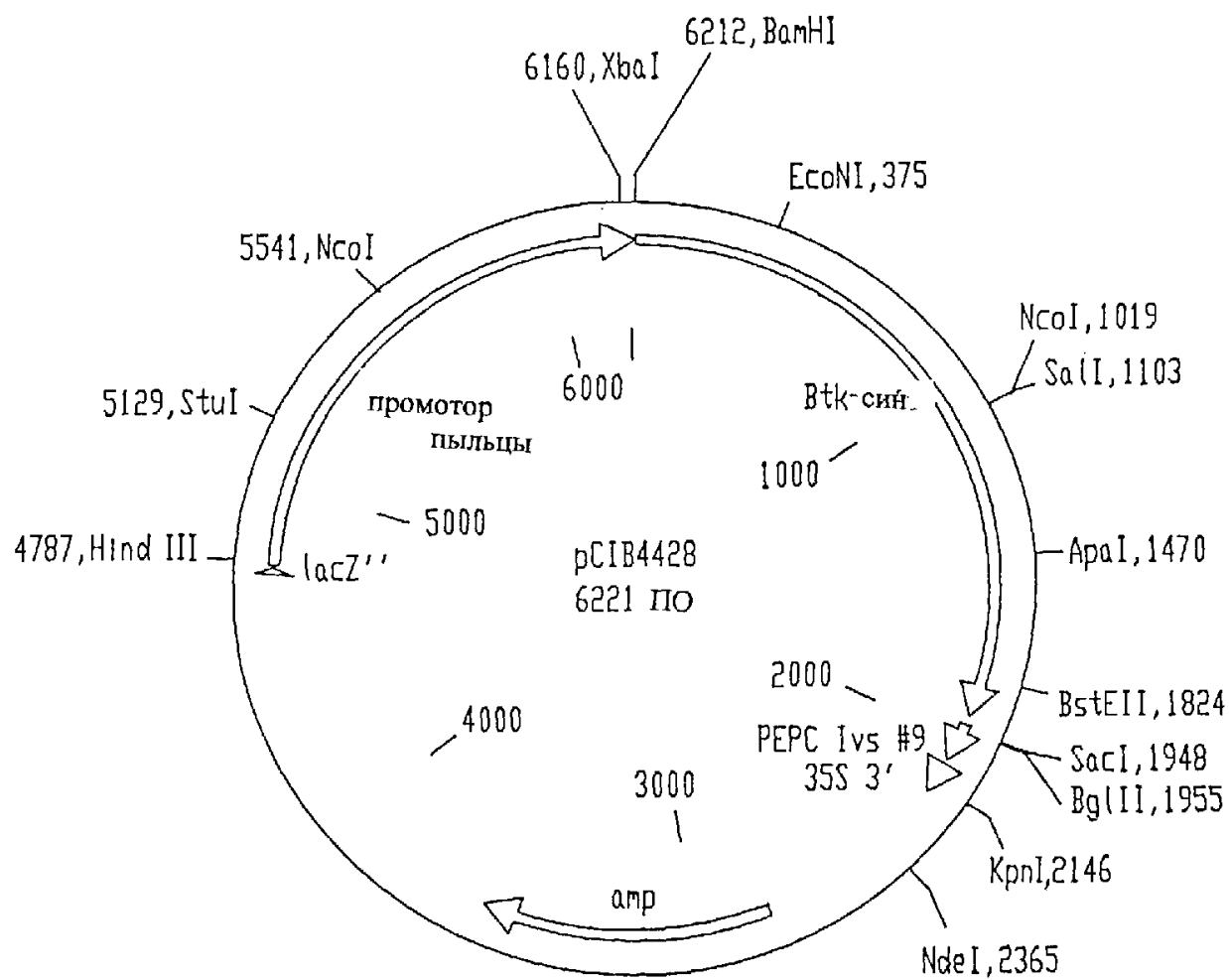
Фиг. 18



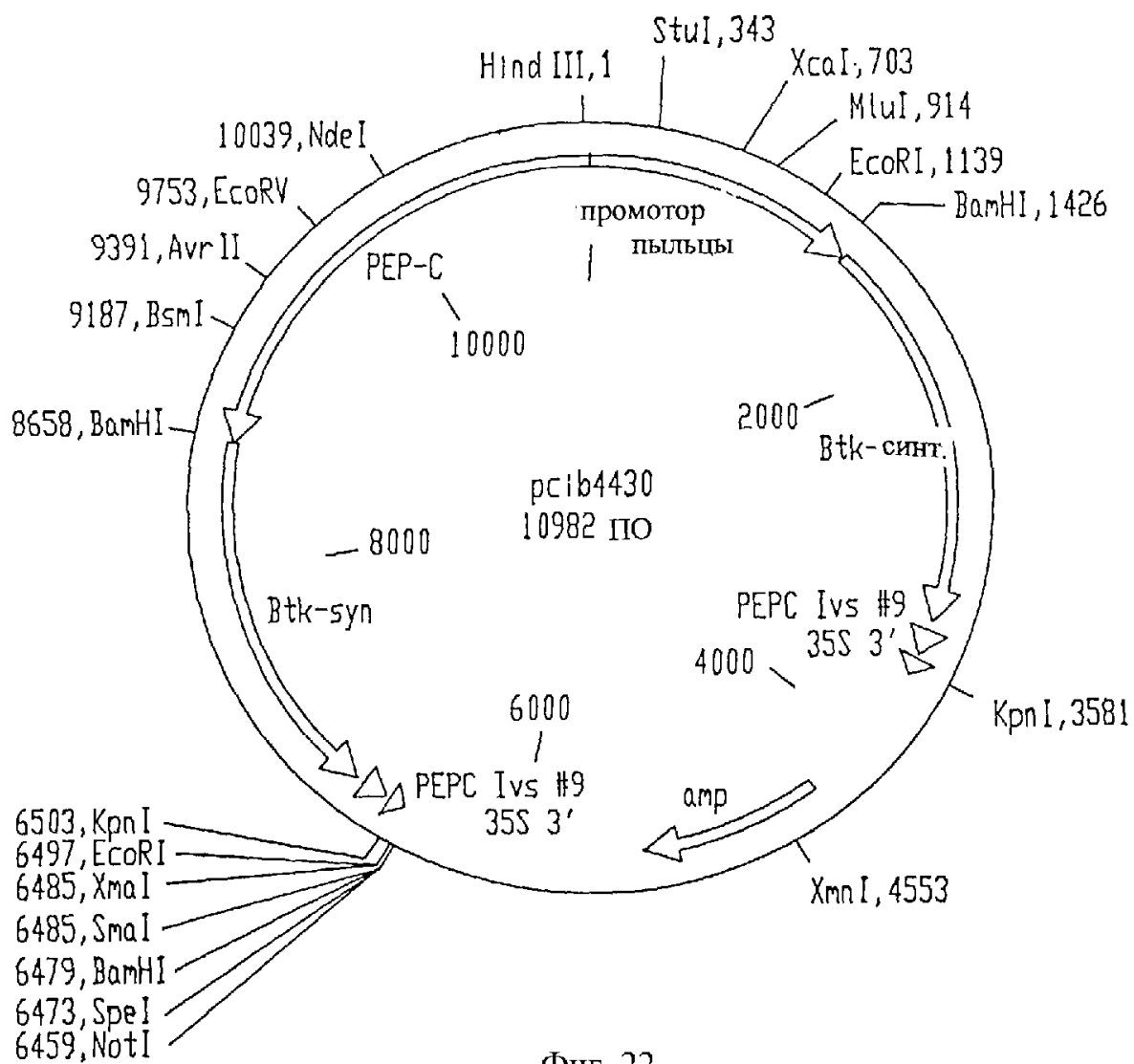
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

УРОВНИ CryIA/b/ ПРОТЕИНА В ТРАНСГЕННОЙ КУКУРУЗЕ

ELISA Вт величины для полевых растений:

инбред. х родит.	ABRU	число раст.	нг Вт/мг протеина
2ND01X171-4A		1646	29
5N984X171-4A		857	1705
5N984X171-4A		870	1760
5N984X171-13		969	22
5N984X171-15		1468	17
5N984X171-15		1470	28
5N984X171-14A		1502	180
5N984X171-14A		1529	1500
5N984X176-11		1667	408
5N984X176-11		1671	1270
5N984X176-11		1673	1522
5N984X176-11		1675	943
5N984X176-11		1679	967
5N984X171-4B		1942	15
5N984X171-4B		1946	16
5NA56X171-16ABX		1101	30
5NA89X176-11		1622	959
5NA89X176-11		1630	1172
5NA89X176-11		1635	1100
6F010X171-4		825	103
6F010X171-4		832	1298

Вт уровни в нг CryIA/b/ на мг полного протеина

Данные для потомства описанных трансформантов кукурузы, экспрессирующих CryIA/b/ протеин

ELISA анализ трансгенного растительного материала в соответствии со стандартными описанными методиками

Фиг. 23А

Биоанализ для мотылька кукурузного, *Ostrinia Nubilalis* и
огневки сахарного тростника, *Diatraea saccharalis*

плазмидный промотор скрещивание №раст.			Вт.ген	%гибели		
				Ostrinia	Diatraea	
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-88	21	+	100	100
			22		0	0
			40	+	100	100
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-11	95	+	100	100
			96		0	0
			98	+	100	100
pCIB4418	35S	5N984 X 171-14A	45		0	10
			64	+	100	90
			68	+	100	100
pCIB4431	PEPC	2N217AF X 176-88	1	.	0	0
			3	+	100	100
			4	+	100	100
pCIB4418	35S	2N217AF X 171-15	70	.	10	0
			83	+	90	80
			88	+	90	100

Фиг. 23В

RU 2202611 C2

RU 2202611 C2

УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕИНА В ТРАНСГЕННОЙ КУКУРУЗЕ

Тепличные растения

35 линия	листья	сердцевина	корни	пыльца
6F010 x 171-4A	409 + 288	NT	NT	NT
5N984 x 171-14A	256 + 159	191	198	30
6F010 x 171-16AB	240 + 174	221	271	NT
5N984 x 171-13	201 + 94	NT	NT	NT
5NA89 x 171-13	37 + 7	150	0	NT
5N984 x 171-18	7.7 + 3	NT	NT	NT
6N615 x 171-16AB	7.5 + 3	0	0	
PERC линия				
6N615 x 176-11	1125 + 419	41	19	NT
6F010 x 176-10	774 + 159	NT	NT	130
5N984 x 176-11	719 + 128	16	20	186

Вт уровни в нг CryIA/b/ /мг полного протеина

Данные для потомства описанных трансформантов кукурузы,экспрессирующих CryIA/b/ протеин

ELISA анализ трансгенного растительного материала в соответствии со стандартными описанными методиками

Фиг. 23С

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

**БИОАНАЛИЗ МОТЫЛЬКА КУКУРУЗНОГО *Ostrinia Nubilalis*
НА КУКУРУЗЕ СЕРДЦЕВИНА : СИН.Вт**

плазмида	промотор	вид	№ раст.	%гибели
pCIB4433	сердцевина	JS21A- верх	1	90
			3	80
			11	90
			13	70
			14	75
			19	85
			28	80
pCIB4433	сердцевина	JS22D-середина	3	70
			4	65
			7	85
			17	95
		контроль	1	5
			2	0
			3	0

Фиг. 23D

Экспрессия *sgu1A/b/* гена в трансгенной кукурузе с использованием сердцевино-предпочтительного промотора

Образцы листьев от маленьких растений трансформированных pC1B4433, описанным способом анализируют на наличие *sgu1A/b/* протеина с помощью ELISA. Все растения, экспрессирующие *sgu1A/b/* оказались инсектицидными в стандартном анализе для мотылька кукурузного

При этом сердцевино-предпочтительный промотор имеет низкий, н. детектируемый уровень экспрессии в ткани листьев кукурузы. Определение *Sgu1A/b/* протеина согласуется с характером экспрессии

№ растения		нг <i>sgu1A/b/</i> /мг протеина
JS21A-1	верх	169
JS21A-2	верх	0
JS21A-3	верх	113
JS21A-11	верх	127
JS21A-12	верх	112
JS21A-13	верх	97
JS21A-14	верх	118
JS21A-19	верх	82
JS21A-24	верх	0
JS21A-28	верх	154
JS22D-3	середина	2946
JS22D-4	середина	5590
JS22D-11	середина	215
JS22D-17	середина	3004

Фиг. 23Е

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

1	GAATTCGGATCCATTAAAGAAGTCTTTGAACAGATTCTAGAGATCTAGTTTAAATGAGCTC	60
61	CCAAAAGTCTTGAAAAAATTCAGCGGGGAGGCCATTAGGGCAGGGGTACTGTTATGTTTT	120
121	AAAGAGAACACCACTTTCTTGATCTCTTCTAAAGAGAAATGTTTGTAAAGAAGGATCCTG	180
181	TCCTCCTCATCCAACCTTTTCATCGGCAAATTTTTCATAGAGATATTAGAGGCAAGAGAG	240
241	GGGCCAAAAAGATCCATGTAAATGGAAGTGGCCACCTGGTTGATACCTCCCTCATCTTCA	300
301	ACAGAAAATCCATTATGAAAAAGTGAATGGATTTTAAACTCTTCTTTTTCTTCCCTTTTG	360
361	CAATGAGCTGAAAATATCTGGTATTATTCTCATCACCCCTCATTAATGAATCTGTCCCTAG	420
421	CAATTTGCTTTTCTCTTGATCCCTTCTGCAGCCACCATTGTTTCTTAAATTCCACTCCATAT	480
481	CAAGCTTTTCCAATCTATCAGAATCTGAGATGGCTGCAATCTCTCTCATTTTCTCAAGGA	540
541	TATCGATGTTATCCATAAGGTATTTCTTGAACCTTCTTATATTTCCCTTCGACATTTATAT	600
601	TCCATCCTTTCAACATTTTTTTGTTCATCTTTTTTGTTTTTTTCCTTTCCAAACATCGA	660
661	TACATTTCCCTGCTCCTCACAGGTAAGGACGAGCTTTCAAAAAACCTTCTGCTTTAAAGTC	720
721	AGGTCTGAGCCTCCAGCAAAGCTCACATATCTAAAGTCCCTCTTCTTAGTTGGGACAGAG	780
781	TCAGTGCTAAGACACATGGGAACATGACCAGAAAAAATCATATTTAGCCCAGAGAC	840
841	AACAATATTCTTGTACTGCAAGTCTCGTTATGGGCTAGCAAAGGAATCTACCCAACCTTCT	900
901	CAAATGTGTTGGGATGTCAAGTATATAGACTATTATCATAGTTCCAACCTCTATCAAACCTGT	960
961	GCAGCTCAATTATAGAGTTGAATAAAGTGTCCATCTATTTGTTCTTATCCTCATATTTG	1020
1021	GTAAAGATATTAAATCACCTCCCACCAACATTTAAAGTGCACCATTTAAAGTGGCTCGC	1080
1081	GAGCACCAAACCGCTGAAAACCGGAAATGTTTAGCACGTTGGCAGCGGGACCCCTTTTCTA	1140
1141	TCTCATCGTGTCTTCTCGTTGTCCACCACGGCCACGGGCCAACGCTCCTCCATCCTGTAG	1200
1201	TGTAGAGTATATTCCATTTGCGACCGAGCCGAGCATCGATCCAGCCACACTGGCCACTGC	1260
84		
1261	CAGCCAGCCATGTGGCACTCCTACGTATACTACGTGAGGTGAGATTCACTCACATGGGAT	1320
-465		-405
1321	GGGACCGAGATATTTTACTGCTGTGGTTGTGTGAGAGATAATAAAGCATTATGACGATT	1380
1381	GCTGAACAGCACACACCATGCGTCCAGATAGAGAAAGCTTCTCTCTTTATTTCGCATGCA	1440
1441	TGTTTCATTATCTTTTATCATATATATATAACACATATTAAATGATTCTTCGTTCCAATT	1500
-285		-226
1501	TATAATTCATTTGACTTTTTTATCCACCGATGCTCGTTTTATTAAAAAAATATTATAAT	1560
-225		-166
1561	TATTGTTACTTTTTGTTGTAATATTGTTTAGCATATAATAAACTTTGATACTAGTATGTT	1620
-165		-106
49		
1621	TCCGAGCAAAAAAATATTAATATTTAGATTACGAGGCCATTAAATTAATTATATTCGAG	1680
-105		-46
83 +1		
1681	ACAAGCGAAGCAAAGCAAAGCAAGCTAATGTTGCCCTGCTGTGCATGCAGAGGCCCGCT	1740
-45		+15
73*****		
1741	CTTGCTATAAACGAGGCAGCTAGACGCGACTCGACTCATCAGCCTCATCAACCTCGACGA	1800
+16		+75

1801	AGGAGGAACGAACGGACAGGTTGTTGCACAGAAGCGACATGGCTTTCGCGCCCAAAACGT	1860
+76		+135
M A F A P K T S		

Фиг. 24

1861	38 CCTCCTCCTCCTCGCTGTCTCTCGGCGTTGCAGGCAGCTCAGTCGCCGCCGCTGCTCCTGA	1920
+126	S S S S L S S A L Q A A Q S P P L L L R	+195
1921	GGCGGATGTCGTCGACCGCAACACCGAGACGGAGGTACGACGCCGCCGTCGTCGTCCTA	1980
+196	R M S S T A T P R R R Y D A A V V V T T	+255
1981	CCACCACCACTGCTAGAGCTGCGGCGGCTGCTGTACGGTTCCCGCCGCCCGCCGCGCAGG	2040
+256	T T T A R A A A A A V T V P A A P P Q A	+315
2041	CGGGCCGCCGCCGCCGGTCCACCAAAGCAAGCGGCCGCCGCCGAGAGGAGCGCTC	2100
+316	G R R R R C H Q S K R R H P Q R R S R P	+375
2101	CGGTGTGCGACACCATGGCGGCGCTCATGGCCAAGGGCAAGGTTTCGTATAGTACGCGCGC	2160
+376	V S D T M A A L M A K G K	
2161	GTGTCGTCGTCGTTATTTTGCGCATAGGCGCGGACATACACGTGCTTTAGCTAGCTAACA	2220
2221	GCTAGATCATCGGTGCAGACGGCGTTTCATCCCGTACATCACCGCCGGCGACCCGGACCTA	2280
	T A F I P Y I T A G D P D L	
2281	GCGACGACGGCCGAGGCGCTGCGTCTGCTGGACGGCTGTGGCGCCGACGTCATCGAGCTG	2340
	A T T A E A L R L L D G C G A D V I E L	
2341	GGGGTACCCTGCTCGGACCCCTACATCGACGGGCCCATCATCCAGGCGTCGGTGGCGCGG	2400
	G V P C S D P Y I D G P I I Q A S V A R	
2401	GCTCTGGCCAGCGGCACCACCATGGACGCCGTGCTGGAGATGCTGAGGGAGGTGACGCCG	2460
	A L A S G T T M D A V L E M L R E V T P	
2461	GAGCTGTGCTGCCCCGTGGTGTCTCTCTACTACAAGCCCATCATGTCTCGCAGCTTG	2520
	E L S C P V V L L S Y Y K P I M S R S L	
521	GCCGAGATGAAAGAGGCGGGGGTCCACGGTAACTATAGCTAGCTCTTCCGATCCCCCTTC	2580
	A E M K E A G V H	
2581	AATTAATTAATTTATAGTAGTCCATTTCATGTGATGATTTTTGTTTTTCTTTTTACTGACA	2640
2641	GGTCTTATAGTGCCTGATCTCCCGTACGTGGCCGCGCACTCGCTGTGGAGTGAAGCCAAG	2700
	G L I V P D L P Y V A A H S L W S E A K	
2701	AACAACAACCTGGAGCTGGTAGGTTGAATTAAGTTGATGCATGTGATGATTTATGTAGCT	2760
	N N N L E L	
2761	AGATCGAGCTAGCTATAATTAGGAGCATATCAGGTGCTGCTGACAACACCAGCCATACCA	2820
	V L L T T P A I P	
2821	GAAGACAGGATGAAGGAGATCACCAAGGCTTCAGAAGGCTTCGTCTACCTGGTAGTTATA	2880
	E D R M K E I T K A S E G F V Y L	
2881	TGTATATATAGATGGACGACGTAACCTCATTCAGCCCCATGCATATATGGAGGCTTCAAT	2940
2941	TCTGCAGAGACGACGAAGACCACGACGACGACTAACACTAGCTAGGGGCGTACGTTGCG	3000
3001	GTGAGCGTGAACGGAGTGACAGGTCTCTCGCGCAAACGTGAACCCACGAGTGGAGTCACTC	3060
	V S V N G V T G P R A N V N P R V E S L	

Фиг. 24 (продолжение)

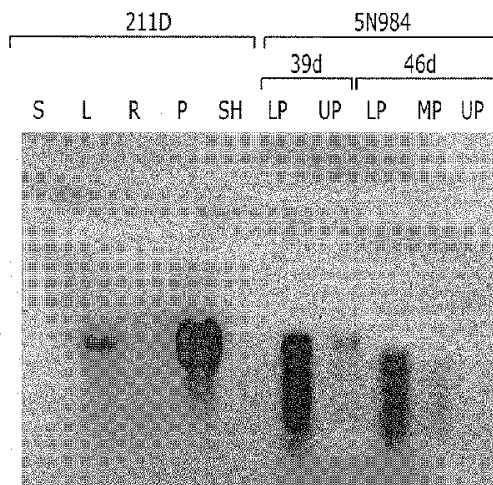
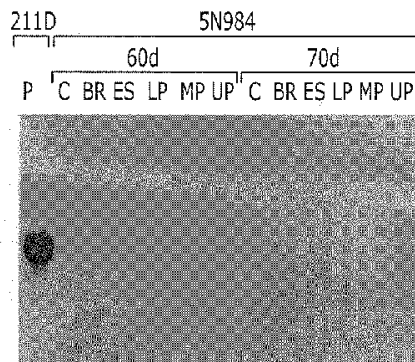
3061	ATCCAGGAGGTTAAGAAGGTGACTAACAAGCCCGTTGCTGTTGGCTTCGGCATATCCAAG	3120
	I Q E V K K V T N K P V A V G F G I S K	
3121	CCCAGACACGTGAAGCAGGTACGTACGTAGCTGACCAAAAAAACTGTTAACAAGTTTTG	3180
	P E H V K	
3181	TTTGACAAGCCGGCTACTAGCTAGCTAACAGTGATCAGTGACACACACACACACAGAT	3240
	Q I	
3241	TGCGCAGTGGGGCGCTGACGGGGTGATCATCGGCAGCGCCATGGTGAGGCAGCTGGGCGA	3300
	A Q W G A D G V I I G S A M V R Q L G E	
3301	AGCGGCTTCTCCCAAGCAAGGCCTGAGGAGGCTGGAGGAGTATGCCAGGGGCATGAAGAA	3360
	A A S P K Q G L R R L E E Y A R G M K N	
	+++	
3361	CGCGCTGCCATGAGTCCATGACAAAGTAAAACGTACAGAGACACTTGATAATATCTATCT	3420
	A L P	
3421	ATCATCTCGGAGAAGACGACCGACCAATAAAAAATAAGCCAAGTGGAAGTGAAGCTTAGCT	3480
3481	GTATATACACCGTACGTCGTCGTCGTCGTTCCGGATCGATCTCGGCCGGCTAGCTAGCAG	3540
3541	AACGTGTACGTAGTAGTATGTAATGCATGGAGTGTGGAGCTACTAGCTAGCTGGCCGTTT	3600
3601	ATTCGATTATAATTCTTCGCTCTGCTGTGGTAGCAGATGTACCTAGTCGATCTTGTACGA	3660
3661	CGAAGAAGCTGGCTAGCTAGCCGTCTCGATCGTATATGTACTGATTAATCTGCAGATTGA	3720
	\$	
3721	ATAAAAACTACAGTACGCATATGATGCGTACGTACGTGTGTATAGTTTGTGCTCATATAT	3780
3781	GCTCCTCATCACCTGCCTGATCTGCCCATCGATCTCTCTCGTACTCCTTCCTGTTAAATG	3840
3841	CCTTCTTTGACAGACACACCACCACCAGCAGCAGTGACGCTCTGCACGCCGCCGCTTTAA	3900
3901	GACATGTAAGATATTTTAAGAGGTATAAGATACCAAGGAGCACAAATCTGGAGCACTGGG	3960
3961	ATATTGCAAAGACAAAAAAAACAAAATTAAGTCCCAACAAAGTAGAGATAGTAAAGA	4020
4021	GGTGGATGGATTAAATATCTCATGATTTTGGATCTGCTCAAAATAGATCGATATGGTA	4080
4081	TTCAGATCTATGTTGTATAGCCTTTTCATTAGCTTTCTGAAAAAAAATGGTATGATGAG	4140
4141	TGCGGAGTAGCTAGGGCTGTGAAGGAGTCGGATGGGCTTCCACGTACTTGTTTGTGGCCC	4200
01	TAGTCCGGTTCTATTTAGGTCCGATCCGAGTCCGGCATGGTCCGGTTCCATACGGGCTAG	4260
4261	GACCAAGCTCGGCACGTGAGTTTTAGGCCCGTCGGCTAGCCCGAGCACGACCCGTTTTTA	4320
4321	AACTGGCTAGGACTCGCCCATTTAATAAGACAAACATTGCAAAAAATAGCTCTATTTTTT	4380
4381	ATTTAAAAATATATTGTTTATTTGTGAAATGTGTATTATTTGTAATATATATTATTGTATA	4440
4441	TAGTTATATCTTCAATTATGATTTATAAAATATGTTTTTTTATTATGAACCAATTTTAAGT	4500
4501	TTGATTTATGCGTTGGCGGGCTCGAGGAGGCACGGTGAACATTTTGGGTCGGGCTTAAC	4560
4561	GGGTCGGCCCGGCCCGGTTTCGGCCCATCCACGGCCCATCCCGTGTGGCCTCGTTCGGTG	4620
4621	AGTTCAGCCCGTCGGACAACCCGTCCCCGGCCCGGATAATTAATCGGGCCTAACCGTGGC	4680
4681	GTGCTTAAACGGTCCGTGCCTCAACGGACCGGGCCGCGGGCGGCCGTTTGACATCTCTA	4740
4741	GTGGTGTGATTAGAGATGGCGATGGGAACCGATCACTGATTCCGTGTGGAGAATTTCGATA	4800
4801	TCAAGCTTATCGATACC	4817

Полная последовательность TgrA гена кукурузы с интронами и эксонами, стартами транскрипции и трансляции, начало и конец кДНК.

S= начало и конец кДНК; +1= начало транскрипции; 73***** =начало экстенсивного начала; ↓ =начало трансляции; +++=стоп кодон; _____=ССААТ Вох, ТАТАА Вох, поли А сайт присоединения.

над подчеркнутой последовательностью=PCR праймеры

Фиг. 24 (продолжение)

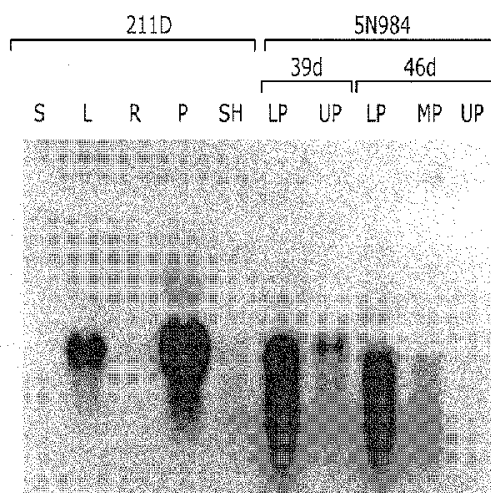
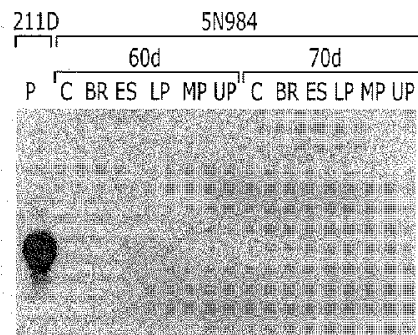


Northern blot showing differential expression of TrpA gene in maize tissues.
2 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

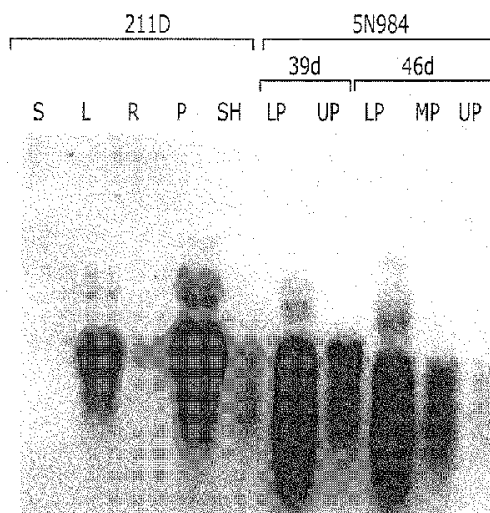
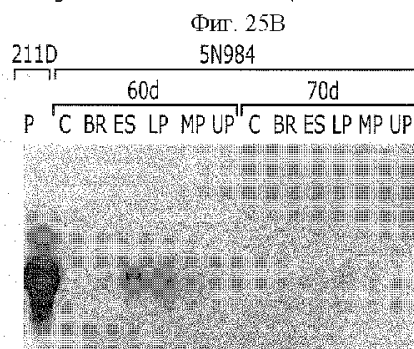
Фиг. 25А

RU 2202611 C2

RU 2202611 C2

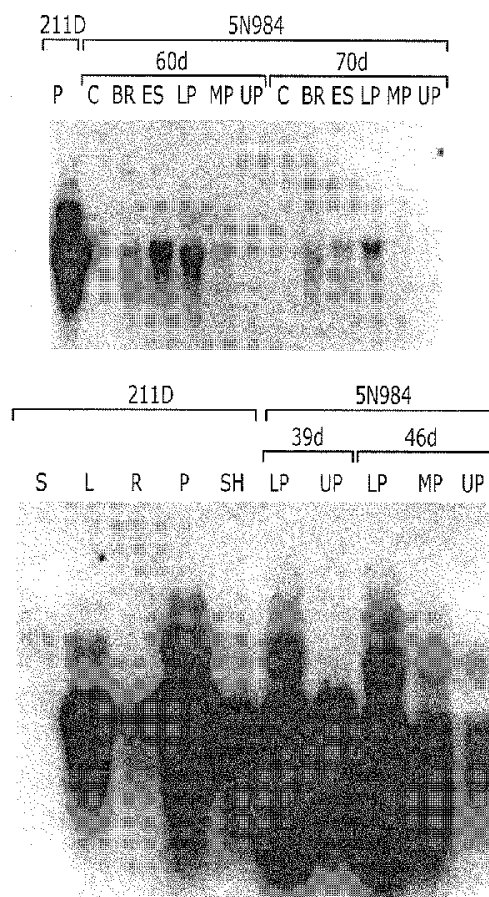


Northern blot showing differential expression of TrpA gene in maize tissues.
4 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.



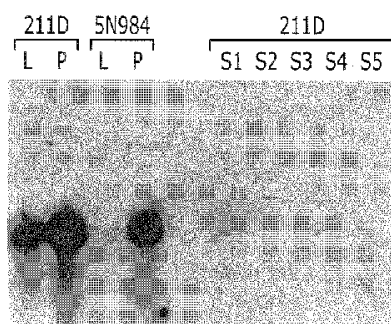
Northern blot showing differential expression of TrpA gene in maize tissues.
18 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

Фиг. 25C



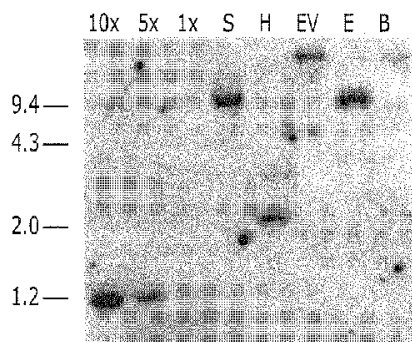
Northern blot showing differential expression of TrpA gene in maize tissues.
48 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

Фиг. 25D



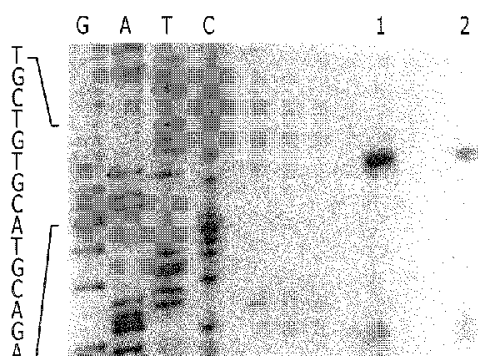
Northern blot showing maize TrpA gene expression in
Funk lines 211D and 5N984 leaf and pith and the absence
of expression in 211D seed total RNA. 65 hour exposure
against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

Фиг. 26



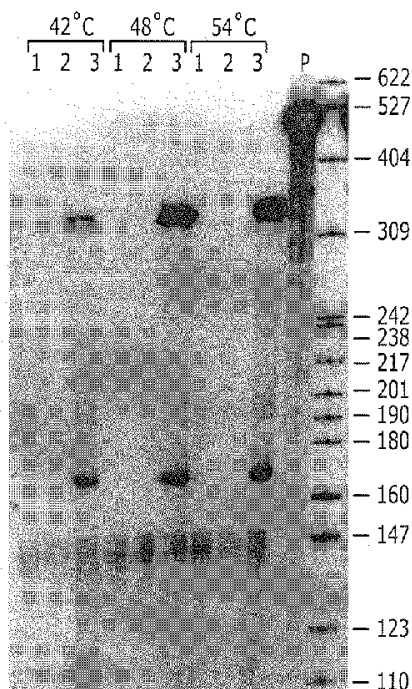
Genomic southern of Funk line 211D probed with the TrpA cDNA 8-2. B = BamHI, E = EcoRI, EV = EcoRV, H = HindIII and S = SacI. 120 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

Фиг. 27



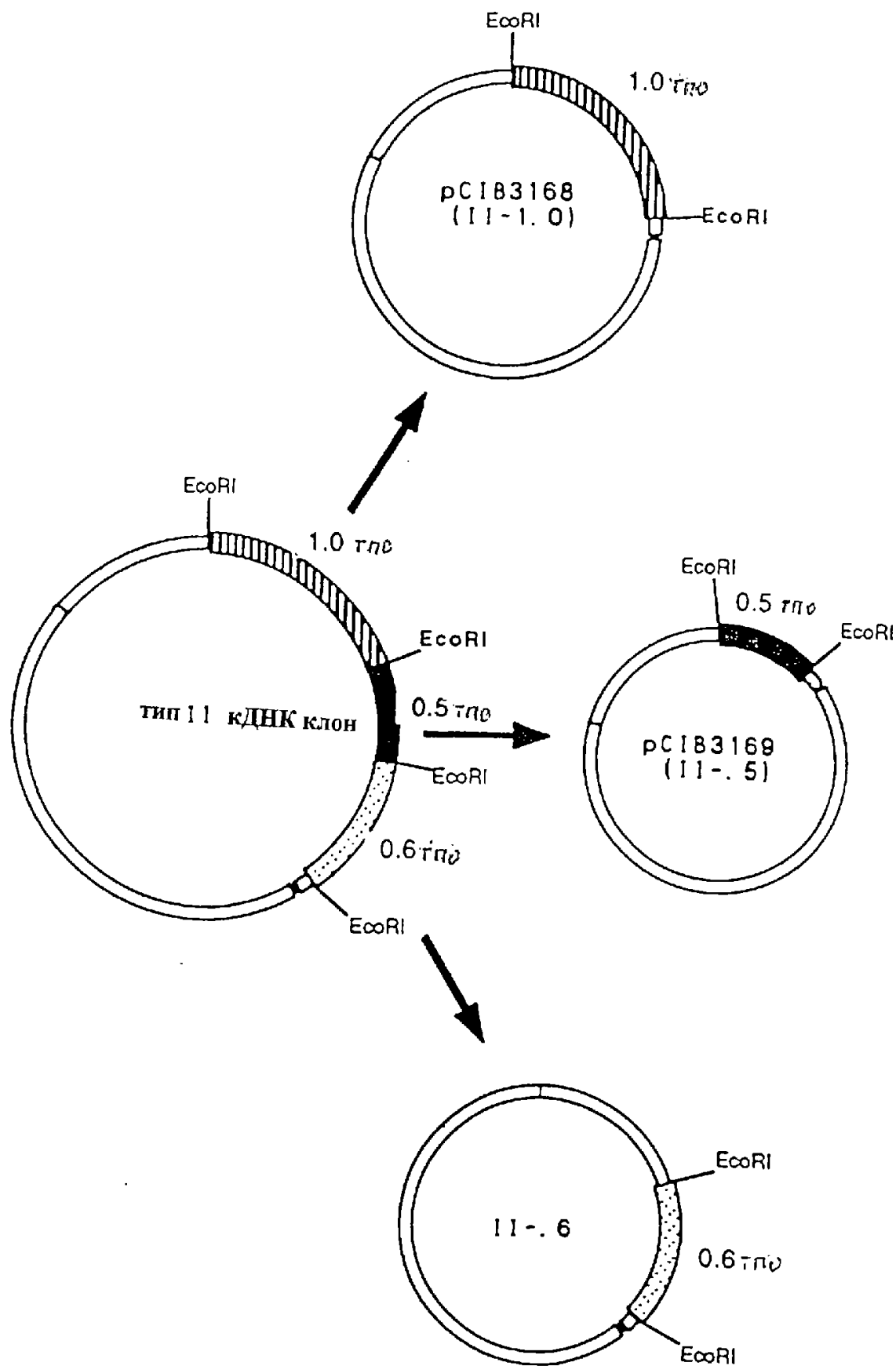
Primer extension showing the transcription start of TrpA gene and sequencing ladder. 1 hour exposure against film at -80C with Dupont intensifying screens.

Фиг. 28A



RNase protection of region from +2 bp to +387 bp with three annealing temperatures. 16 hour exposure against film at -80C with Dupont Cronex intensifying screens.

Фиг. 28B



Фиг. 29

СДРК кДНК последовательность пыльцы кукурузы
Последовательность , содержащаяся в клонах pCIB3168 и pCIB3169

```

1  TG CAG ATC ATG CAC CAC CTC TCC GGC CAG CCC AAC GTG GTG GGC CTC CGC GCG GCG
171 Gln Ile Met His His Leu Ser Gly Gln Pro Asn Val Val Gly Leu Arg Gly Ala

57 TAC GAG GAC AAG CAG AGC GTG CAC CTC GTC ATG GAG CTG TGC GCG GGC GGG CAG CTC
191 Tyr Glu Asp Lys Gln Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly Gly Glu Leu

                                     Aval
114 TTC GAC CGC ATC ATC GCC CGG GGC CAG TAC ACG GAG CGC GGC GCC GCG GAG CTG CTG
381 Phe Asp Arg Ile Ile Ala Arg Gly Gln Tyr Thr Glu Arg Gly Ala Ala Glu Leu Leu

171 CGC GCC ATC GTG CAG ATC GTG CAC ACC TGC CAC TCC ATG GGG GTG ATG CAC CGG GAC
571 Arg Ala Ile Val Gln Ile Val His Thr Cys His Ser Met Gly Val Met His Arg Asp

                                     Aval
228 ATC AAG CCC GAG AAC TTC CTG CTG CTC AGC AAG GAC GAG GAC GCG CCG CTC AAG GCC
761 Ile Lys Pro Glu Asn Phe Leu Leu Leu Ser Lys Asp Glu Asp Ala Pro Leu Lys Ala

285 ACC GAC TTC GGC CTC TCC GTC TTC TTC AAG GAG GGC GAG CTG CTC AGG GAC ATC GTC
951 Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Phe Lys Glu Gly Glu Leu Leu Arg Asp Ile Val

                                     Aval
342 GGC AGC GCC TAC TAC ATC GCG CCC GAG GTG CTC AAG AGG AAG TAC GGC CCG GAG GCC
1141 Gly Ser Ala Tyr Tyr Ile Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Lys Tyr Gly Pro Glu Ala

399 GAC ATC TGG AGC GTC GGC GTC ATG CTC TAC ATC TTC CTC GGC GGC GTG CCT CCC TTC
3331 Asp Ile Trp Ser Val Gly Val Met Leu Tyr Ile Phe Leu Ala Gly Val Pro Pro Phe

456 TGG GCA GAG AAC GAG AAC GGC ATC TTC ACC GCC ATC CTG CGA GGG CAG CTT GAC CTC
1521 Trp Ala Glu Asn Glu Asn Gly Ile Phe Thr Ala Ile Leu Arg Gly Gln Leu Asp Leu

513 TCC AGC GAG CCA TGG CCA CAC ATC TCG CCG GGA GCC AAG GAT CTC GTC AAG AAG ATG
1711 Ser Ser Glu Pro Trp Pro His Ile Ser Pro Gly Ala Lys Asp Leu Val Lys Lys Met

570 CTC AAC ATC AAC CCC AAG GAG CCG CTC ACG GCG TTC CAG GTC CTC AAT CAC CCA TGG
1901 Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Arg Leu Thr Ala Phe Gln Val Leu Asn His Pro Trp

627 ATC AAA GAA GAC GGA GAC GCG CCT GAC ACG CCG CTT GAC AAC GTT GTT CTC GAC AGG
2091 Ile Lys Glu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Thr Pro Leu Asp Asn Val Val Leu Asp Arg

684 CTC AAG CAG TTC AGG GCC ATG AAC CAG TTC AAG AAA GCA GCA TTG AGG ATC ATA GCT
2281 Leu Lys Gln Phe Arg Ala Met Asn Gln Phe Lys Lys Ala Ala Leu Arg Ile Ile Ala

741 GGG TGC CTA TCC GAA GAG GAG ATC ACA GGG CTG AAG GAG ATG TTC AAG AAC ATT GAC
2471 Gly Cys Leu Ser Glu Glu Glu Ile Thr Gly Leu Lys Glu Met Phe Lys Asn Ile Asp

798 AAG GAT AAC AGC GGG ACC ATT ACC CTC GAC GAG CTC AAA CAC GGG TTG GCA AAG CAC
2661 Lys Asp Asn Ser Gly Thr Ile Thr Leu Asp Glu Leu Lys His Gly Leu Ala Lys His

855 GGG CCC AAG CTG TCA GAC AGC GAA ATG GAG AAA CTA ATG GAA GCA GCT GAC GCT GAC
2851 Gly Pro Lys Leu Ser Asp Ser Glu Met Glu Lys Leu Met Glu Ala Ala Asp Ala Asp

                                     EcoRI
912 GGC AAC GGG TTA ATT GAC TAC GAC GAA TTC GTC ACC GCA ACA GTG CAT ATG AAC AAA
3041 Gly Asn Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Glu Phe Val Thr Ala Thr Val His Met Asn Lys

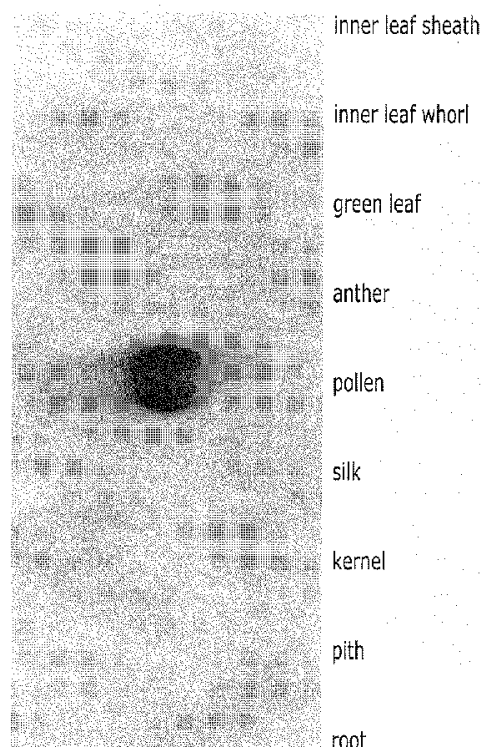
```

Фиг. 30

969 GTG GAT AGA GAA GAG CAC CTT TAC ACA GCA TTC CAG TAT TTC GAC AAG GAC AAC AGC
 323 Leu Asp Arg Glu Glu His Leu Tyr Thr Ala Phe Gln Tyr Phe Asp Lys Asp Asn Ser
 1026 GGG TAC ATT ACT AAA GAA GAG CTT GAG CAC GCC TTG AAG GAG CAA GGG TTG TAT GAC
 342 Gly Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Leu Glu His Ala Leu Lys Glu Gln Gly Leu Tyr Asp
 1083 CCC GAT AAA ATC AAA GAC ATC ATC TCC GAT GCC GAC TCT GAC AAT GAT GGA AGG ATA
 361 Ala Asp Lys Ile Lys Asp Ile Ile Ser Asp Ala Asp Ser Asp Asn Asp Gly Arg Ile
 1140 GAT TAT TCA GAG TTT GTG GCG ATG ATG AGG AAA GGG ACG GCT GGT GCC GAG CCA ATG
 380 Asp Tyr Ser Glu Phe Val Ala Met Met Arg Lys Gly Thr Ala Gly Ala Glu Pro Met
 1197 AAC ATC AAG AAG AGG CGA GAC ATA GTC CTA TAG TGAAGTGAAGCAGCAAGTGTGTAATGTAATGTG
 399 Asn Ile Lys Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu ...
 1263 TATAGCAGCTCAAACAAGCAAAATTGTACATCTGTACACAAAATGCAATGGGGTAACTTTTGCACAAAAAAAAAAAAAAAA

1340 AAAAAAAAAA

Фиг. 30 (продолжение)



Фиг. 31

LIPMAN-PEARSON PROTEIN ALIGNMENT						
GAP PENALTY: 2, GAP LENGTH PENALTY: 12						
SEQ1	SEQ2	SIMILARITY	GAP	GAP	CONSENSUS	
pol CDPK ptn	rat pk2 ptn	Индекс	номер	длина	длина	
1>551	1>528	36.5	4	4	297	
pol CDPK ptn	YSMGKELGRGQFCVTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREDDVVRREVQIMHHLSGQPNVVGLRGAYE	162				
rat pk2 ptn	YQLFEELGKGAFSVVRRCKTSTQEYAAKIINTKKLSARDH-OKLEREARICRLK-HPNIVRLHDSIS	81				
pol CDPK ptn	DKQSVHLMELCAGGELFDRIIARGQYTERGAAELLRAIVQIVHTCHSMGYMHRDIKPENFLLLSKDEDA	232				
rat pk2 ptn	EEGFHYLVFDLVTGGELFEDI VAREYYSEADASHCIHQILESVDNIHQHDI VHRDLKPENLLLASKCKGA	151				
pol CDPK ptn	PLKATDFGLSVFFKEGELLR-DIVGSAYYIAPEVLKRK-YGPEADIWSVGVMLYIFLAGVPPFWAENENG	300				
rat pk2 ptn	AVKLADFGLAIEVQGEQQAWFGFAGTPGYLSPEVLKRDYPYKGPVDIWACGVILYILLVGYPPFWDEDQHK	221				
pol CDPK ptn	IFTAILRGQLDLSSEPWPHISPGAKDLVKKMLNINPKERLTAFOVLNHPWIKEDGDAPDTPLDNVYLDRL	370				
rat pk2 ptn	LYQIQIKAGAYDFPSPWDYVTPKAKNLINQMLTINPAKRITADQALKHPWYQCRSTVASMHRQETVECL	291				
pol CDPK ptn	KQFRAMNQFKKAALRII	387				
rat pk2 ptn	RKFNARRKLKGAILTTM	308				

Фиг. 32

LIPMAN-PEARSON PROTEIN ALIGNMENT						
GAP PENALTY: 2, GAP LENGTH PENALTY: 12						
SEQ1	SEQ2	SIMILARITY	GAP	GAP	CONSENSUS	
pol CDPK ptn	HUMCAMA ptn	Индекс	номер	длина	длина	
1>551	1>150	40.3	2	2	142	
pol CDPK ptn	LSEEEITGLKEMFKNIDKDNSGTITLDELKHGLAKHGPKLSDSEMEKLMEEAADADGNGLIDYDEFVTATY	460				
humcama ptn	LTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELODMINEVDADGNGTIDFPEFLTHMA	74				
pol CDPK ptn	H-MNKLDREEHLYTAFQYFQKDNNGYITKEELEHALKEQG-LYDADKIKDIISDADSDNDGRIDYSEFVA	528				
humcama ptn	RKMKDSDSEEEIREAFRVFQKDNNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGQGVNVEEFVQ	144				
pol CDPK ptn	MM	530				
humcama ptn	MM	146				

Фиг. 33

UPMAN-PEARSON PROTEIN ALIGNMENT						
GAP PENALTY: 2, GAP LENGTH PENALTY: 12						
SEQ1	SEQ2	SIMILARITY	GAP	GAP	CONSENSUS	
pol CDPK ptn	SOYBEAN CDPK ptn	Индекс	номер	длина	длина	
1>551	1>509	62.4	1	1	464	
pol CDPK ptn	VLGRPMEDYRATYSMGKELGRGQFGVTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREVDVVRREYQIMHHLSG	11::: :				

Фиг. 34

pcr CDPK gene Map (1 > 4165) Сайты и последовательность
 ЭНЗИМЫ: 6-198 энзимы (отфильтрованный)
 Settings : Circular, Certain Sites Only, Standard Genetic Code

```

TTAGTACACCTCTCCAATCGCTTGGGTTGGCACATTCTTAGCTTTATCACATTTTAAGAAATAGAGTTCACCACCTTC
80
AAAATATGCCTATACAATGAATGATGCTTGGATGCAATATAGCTAGATTCAACTAGCTATATATGGTCAATAGAACCTG
160
TGAGCACCCTCACAAACACGACTTCAATTTTGAGACCCTAAGCGAGTAAATGGTTAAAGTCCTCTTATTATTAGTCTTAGG
240
ACTTCTCCTTGCTAAATGCTTGTGACGATCTATATATCTTCCCACTGCGGGAGATACTATATATAGGGCCTTGACCT
320
CTAGGGTATCTCAAAGGCCTAGTCACAACAATTCTCAACAGTATTTAATTTTATACATGTATGAACAGTGTAGGAATTTG
400
GTGCCCAACCCAAGAGTGGGAGGTGTAAATTGGGTAGCTAAACTTAAATAGGGCTCTTCTTATTAGGTTTATCTAGTC
480
TCTACTTAGACTAATTCAGAAAGAATTTTACAACCTATGGTTAATCATATCTCTAGTCTAAGCAAATTTAGGAAAGTTAA
560
AAGCACACAATTAGGCACATGTGAAAGATGTGTATGGTAAGTAAAAGACTTATAAGGAAAAAGTGGGTGAATCCTCAAGA
640
TGTGGTGGTATATCCCAATGATATTAGATGCCAGAATATAGGGGGGAAATCGATGTATACCATCTCTACCAGGATACCTG
720
TGCGGACTGTGCAACTGACACATGGACCATGGTGTCTTCTTAGATTTGGTTATTAGCTAATTGCGCTACAACCTGTTCAA
800
GGCTAGACCAAATTAATAAACTAATATTAACATAAAAAGTTAGGCAAACTATAGTAAATTATGCAGCGATCCAACAACA
880
TCCATGTCTCGTGGGTCATGAGCCACGCGTCGGCCATACCCACATGATGTTTCCATACGGATGGTCCTTATGCAATT
960
TTGTCTGCAAAACACAAGCCTTAATACAGCCACGCGACAATCATGGAAGTGGTCGTTTTAGGTCTCATCATGAAGTTCA
1040
GGGAAAACGCATCAAATGTAATGCAGAGAAATGGTATTTCTTCTCTTGTAATCAGGGAGAGGAGTACCATCAGTACAGA
1120
TTCAGAATCAGAATTCAGTCTTCCAACGACAATAATCGCAGCATCTTGTAATAATTTGCAGAACTTCTGTTTGACTTGT
1200
AGCCCTGACCTTTGCAAATATTTGAAGTTGTGCCTGCTGACACAACCTTCAATCTGGAAGTGCTGTTGATCAGTTTTGCCA
1280
GAAACAGCAAGCAGCCTATATATATCTGTACGAGACACCCTGCCGCCCTCTTCTTTCCCGCCATTCCCTCCCTACCCCT
1360

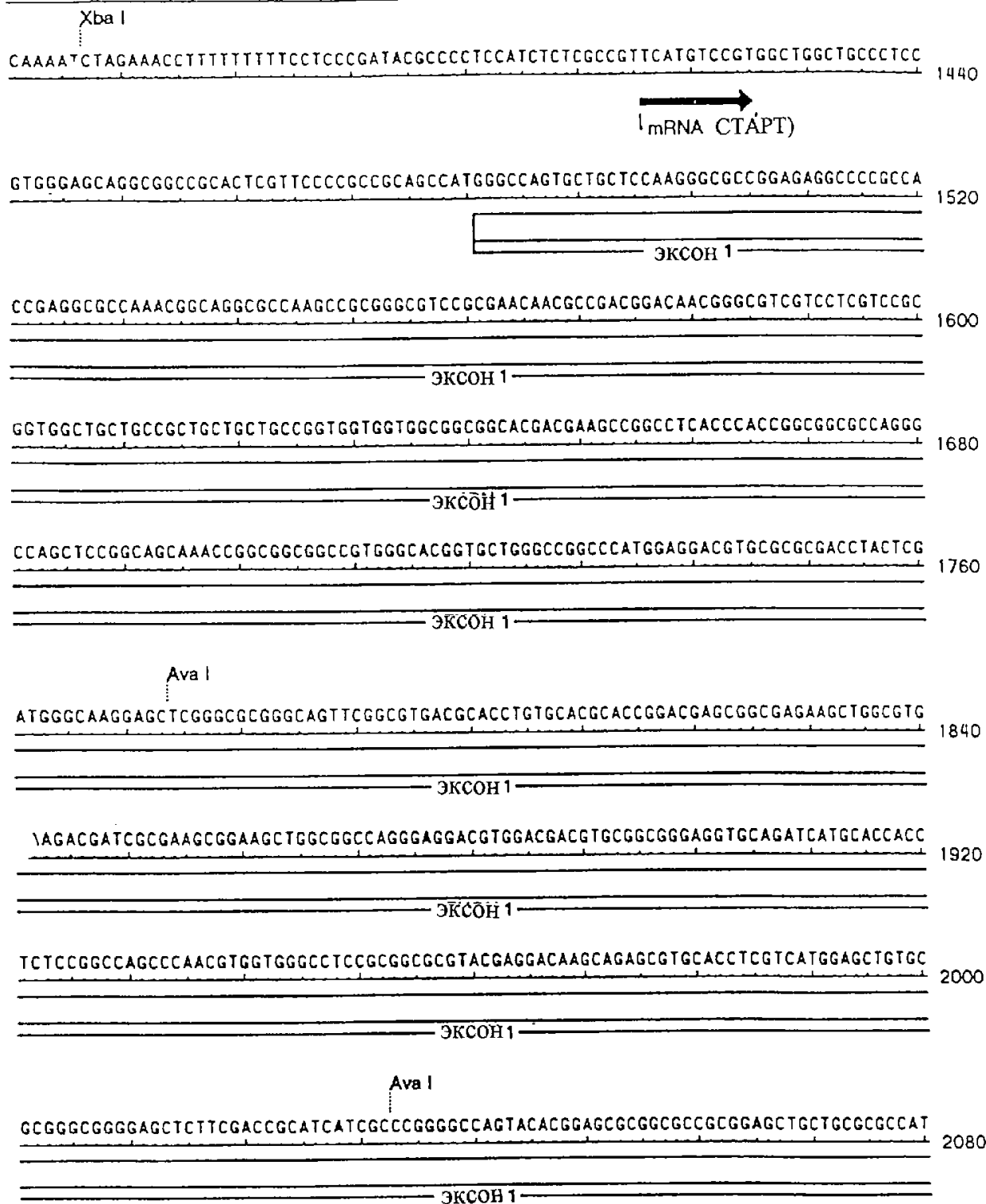
```

EcoRI

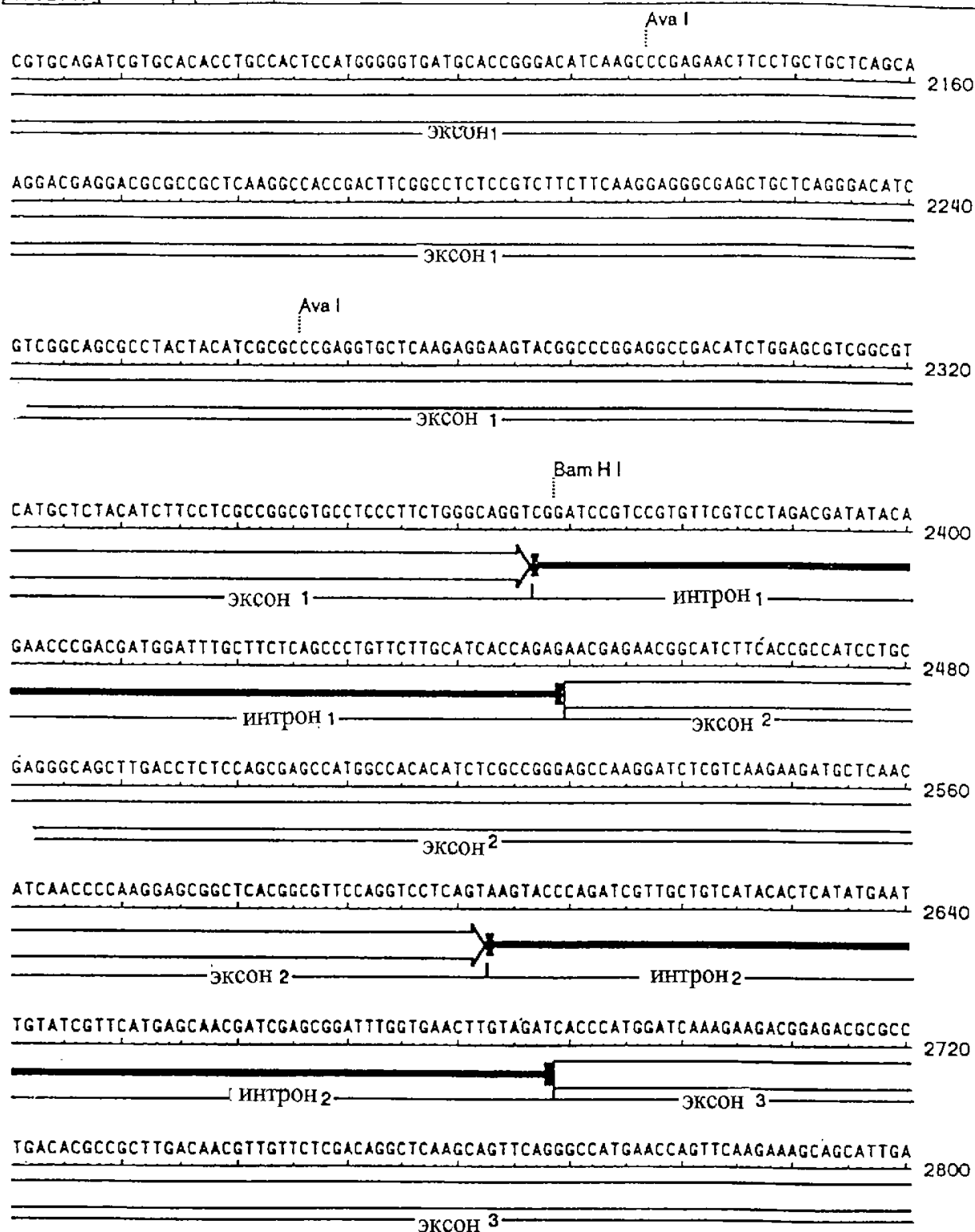
Фиг. 35

RU 2202611 C2

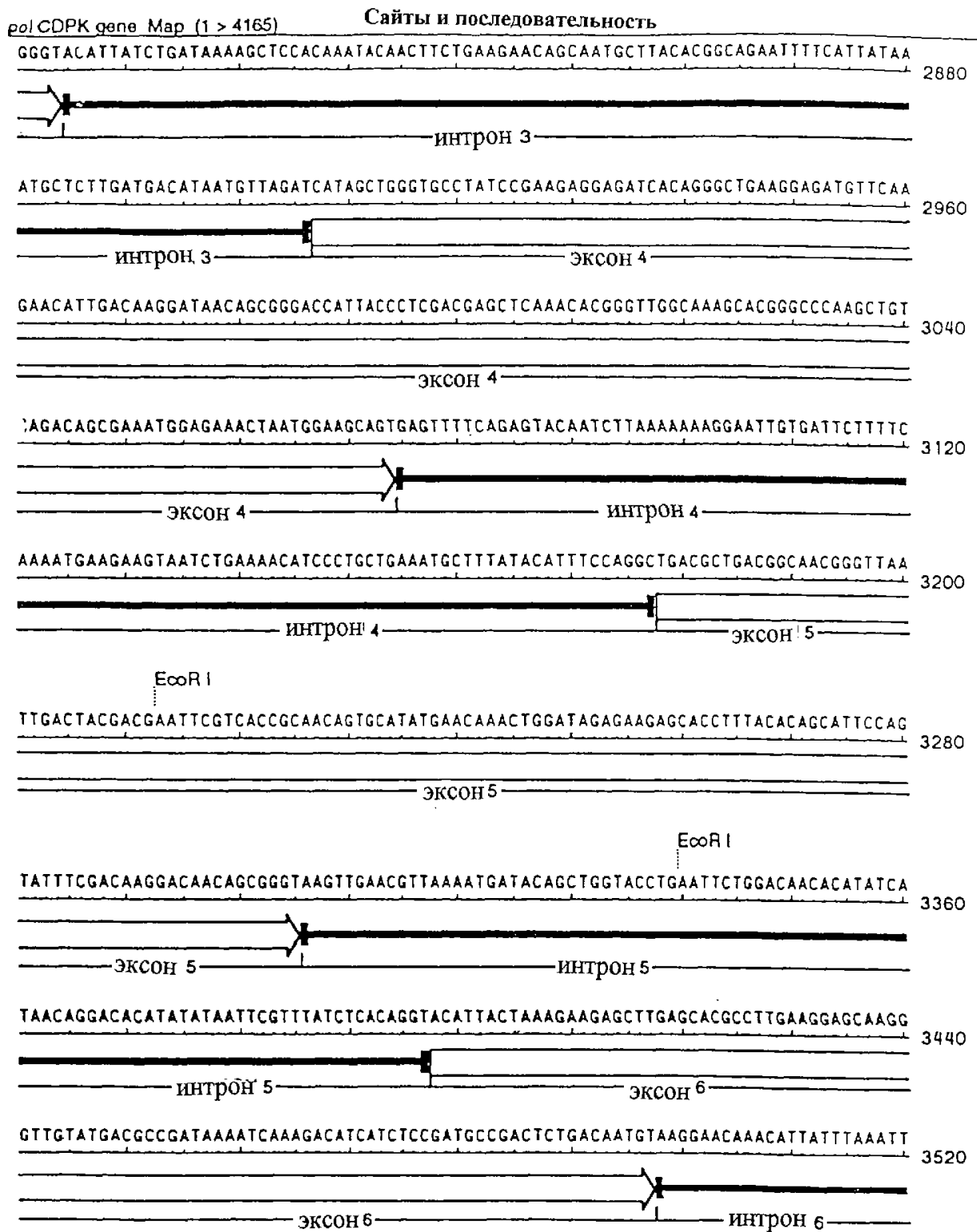
RU 2202611 C2



Фиг. 35 (продолжение)



Фиг. 35 (продолжение)

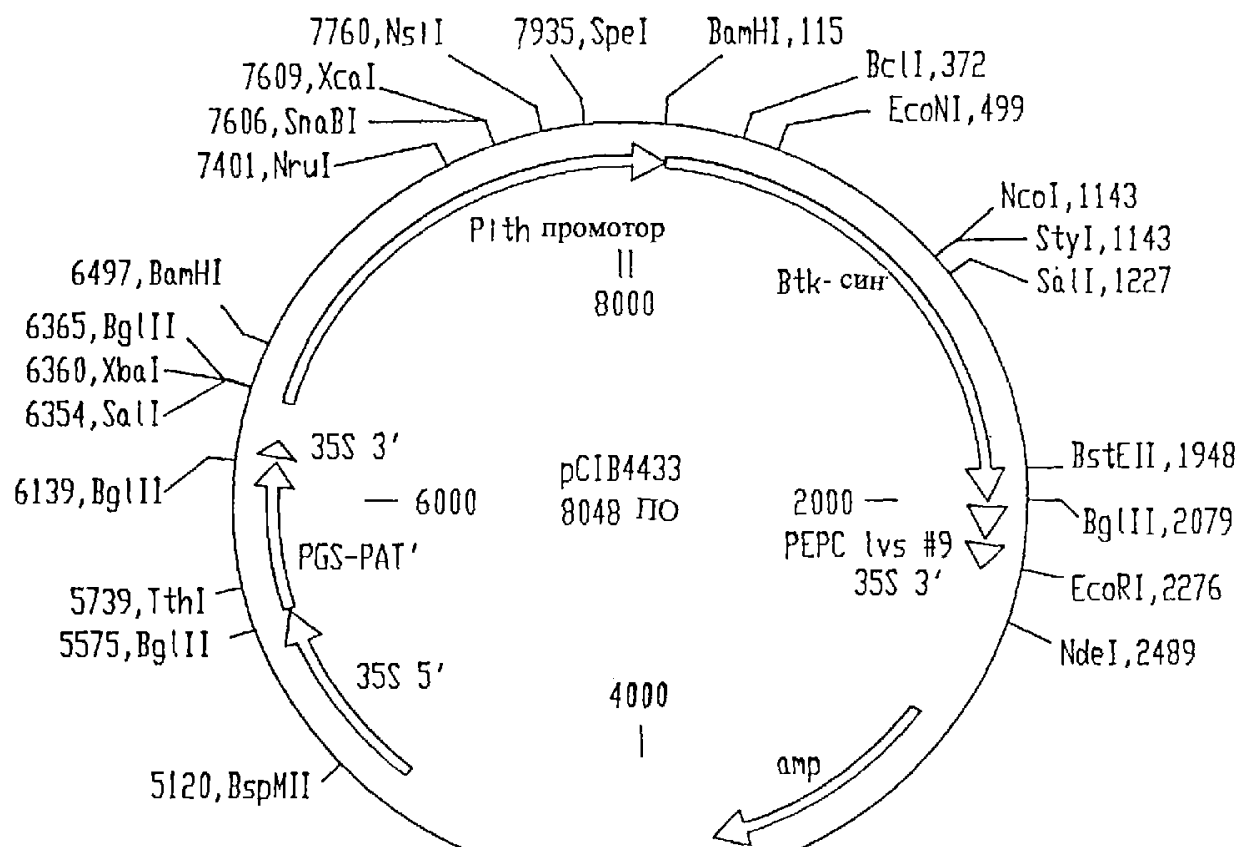


Фиг. 35 (продолжение)



AGGCC
→ 4165

Фиг. 35 (продолжение)



Фиг. 36

NAME: pCIB5515

7415 BPS DNA CIRCULAR UPDATED 9/21/92

ОПИСАНИЕ: PGF1 синтетически измененная

* * * последовательность * * *

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu

61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle

241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla

421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal

481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln

541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle

601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGGCGTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly

661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCACCTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal

781 AGCCAGCTGA CCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe

841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGCGAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu

901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACGAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCGTCTGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGATCCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg

1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu

1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCTTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal

1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

Фиг. 37

RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

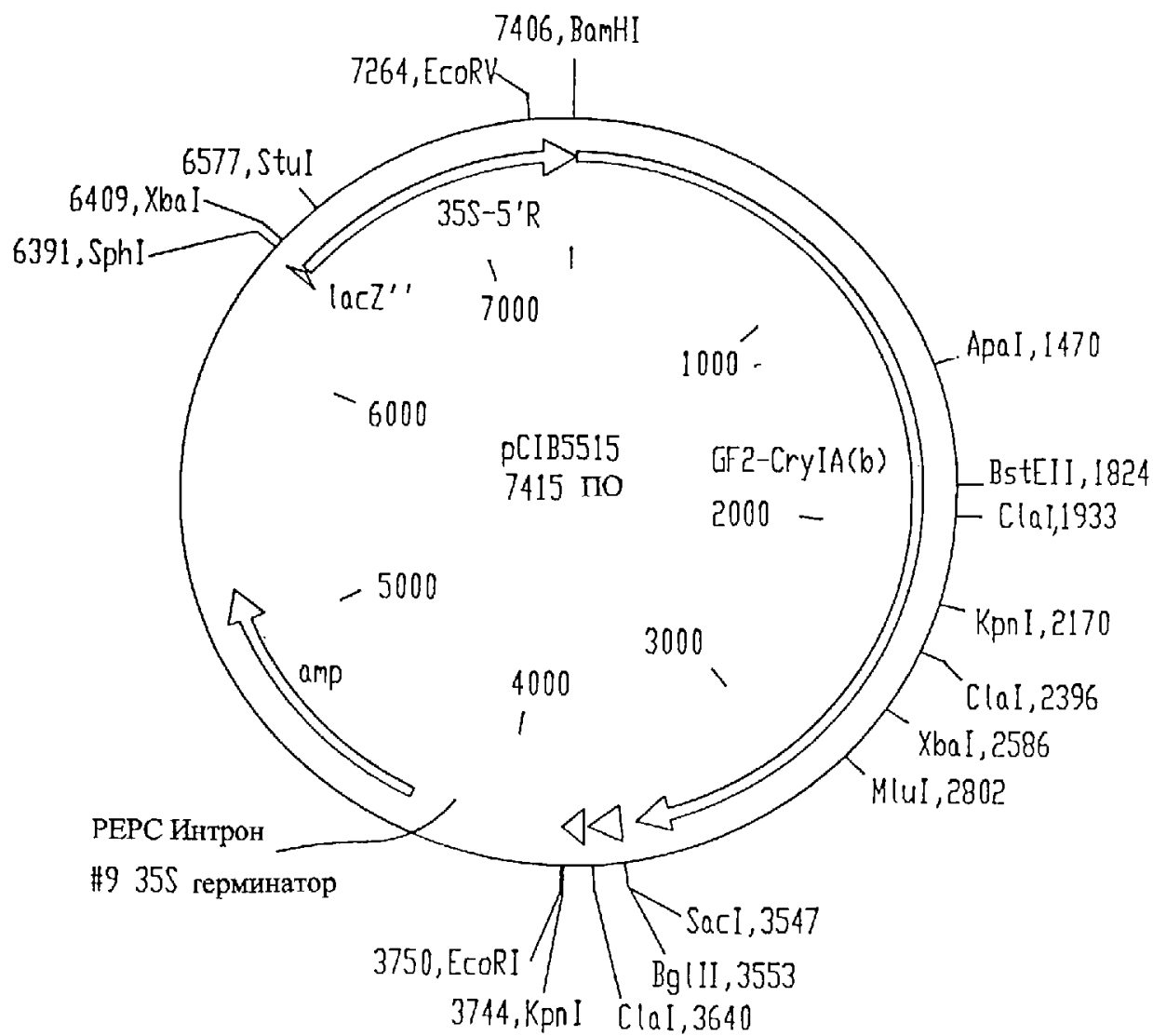
RU 2 2 0 2 6 1 1 C 2

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CTTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCGG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TCGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCCATC ATTCCCATCA TTTCTCCTTG GACATTGATG TTGGATGTAC AGACTTAAAT
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACTTAG GTGTATGGGT GATATTCAAG ATTAAGACGC AAGATGGCCA TGCAAGACTA
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGAAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

Фиг. 37 (продолжение)

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTTCGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTGTGT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu
 3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---

Фиг. 37 (продолжение)



Фиг. 38