



(19) **UA** (11) **73 465** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 9/10, 15/00, 15/09,**
15/29, 15/64, 15/82, A 01H 4/00,
5/00

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 98095007, 24.03.1997
(24) Дата начала действия патента: 15.08.2005
(30) Приоритет: 26.03.1996 US 08/622,679
(46) Дата публикации: 15.08.2005
(86) Заявка PCT:
PCT/US97/04982, 19970324

(72) Изобретатель:
Стайлис Джон И., US,
Моисиади Истефо, US,
Неупане Каби Радж, US
(73) Патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ГАВАИ, US

(54) ОЧИЩЕННЫЕ БЕЛКИ, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК И СПОСОБ
ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ, КОТОРЫЕ НЕ СОДЕРЖАТ КОФЕИНА

(57) Реферат:
Изобретение касается по сути чистой ксантозин-N 7-метилтрансферазы из растения кофе, очищенной последовательности нуклеиновой кислоты кодирующей ее экспрессию, растения кофе, трансформированного с ее помощью, способа и метода получения кофейных зерен, не содержащих кофеина, и способа ингибирования продукции кофеина клетками

растения кофе.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 465** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 9/10, 15/00, 15/09,**
15/29, 15/64, 15/82, A 01H 4/00,
5/00

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 98095007, 24.03.1997

(24) Effective date for property rights: 15.08.2005

(30) Priority: 26.03.1996 US 08/622,679

(46) Publication date: 15.08.2005

(86) PCT application:
PCT/US97/04982, 19970324

(72) Inventor:

STILES JOHN I., US,
MOISYADI ISTEFO, US,
NEUPANE KABI RAJ, US

(73) Proprietor:

UNIVERSITY OF HAWAII, US

(54) **PURIFIED PROTEINS, RECOMBINANT DNA SEQUENCES AND A METHOD FOR THE PREPARATION OF PRODUCTS NOT CONTAINING CAFFEINE**

(57) Abstract:

Purified proteins, DNA sequences that code on expression therefore and recombinant DNA molecules, including hosts transformed therewith, for transforming coffee plants to suppress the expression of caffeine. The DNA sequences and recombinant DNA molecules are characterized in that they code on expression for an enzyme in the pathway for caffeine synthesis in coffee. Coffee plants transformed with DNA molecules that code

on transcription for mRNA that is antisens to mRNA that codes on expression for at least one enzyme in the pathway for caffeine biosynthesis.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 8, 15.08.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **73 465** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 9/10, 15/00, 15/09,**
15/29, 15/64, 15/82, A 01H 4/00,
5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
98095007, 24.03.1997

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 26.03.1996 US 08/622,679

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.08.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/US97/04982, 19970324

(72) Винахідник(и):

Стайліс Джон І. , US,
Моісіаді Істефо , US,
Неупане Кабі Радж , US

(73) Власник(и):

ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ ГАВАЇ, US

(54) ОЧИЩЕНІ БІЛКИ, ПОСЛІДОВНОСТІ РЕКОМБІНАНТНОЇ ДНК І СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПРОДУКТІВ, ЩО НЕ МІСТЯТЬ КОФЕЇНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується по суті чистої
ксантозин-N⁷-метилтрансферази з рослини кави,
очищеної послідовності нуклеїнової кислоти, що

кодує її експресію, рослини кави, трансформованої
з її допомогою, способу та методу одержання
кавових зерен, що не містять кофеїну, і способу
інгібування продукції кофеїну клітинами рослини
кави.

Опис винаходу

Дана заявка стосується очищених білків, послідовностей рекомбінантної ДНК, хазяйських клітин, трансформованих шляхом їх використання, і способів одержання напоїв і продуктів харчування, які не містять кофеїну. Більш детально, дана заявка стосується очищених білків і послідовностей рекомбінантної ДНК, які інгібують експресію кофеїну в рослинах кави та їх плодах. Цей винахід дає стабільні лінії рослин кави, які не містять кофеїну, плоди яких після обсмажування та перемелювання можуть використовуватися для приготування кави, яка не містить кофеїну. Передбачається, що даний винахід можна використовувати для інгібування синтезу кофеїну у чаї (*Camellia sinensis*) та колі (*Cola acuminanta*), а також родинних алкалоїдів у шоколаді (*Theobroma cacao*).

Каву готують з обсмажених і перемелених зерен рослин роду *Coffea*, як правило, виду арабіка (*C. arabica*). Рослини кави продукують алкалоїд кофеїн, який присутній в їх висушених плодах, кавових зернах. У зв'язку з тим, що багато споживачів кави віддають перевагу каві без кофеїну, були розроблені способи видалення кофеїну з кавових зерен. Усі ці способи приводять до видалення із зерен, крім кофеїну, й інших речовин, що приводить до погіршення смаку кави, приготовленої із оброблених такими способами кавових зерен. Хоча відомі декілька сортів рослин кави, що зустрічаються у природі і не містять кофеїну, і близькі до них види (*Mascarocoffea* spp. і *Coffea bengalensis*), вони не мають комерційного значення. (Charrier і Berthaud, "Variation Of Caffeine Content In The Coffea Genus", *Cafe' Cacao The'*, 14:251-264 (1975)). Отже, існує необхідність у способі одержання кавових зерен, які не містять кофеїну, у результаті якого із зерен не будуть видалитися інші речовини, крім кофеїну.

Кофеїн - це природний пуриновий алкалоїд, який продукується у числі інших рослинами кави й чаю. Вважається, що синтез кофеїну захищає рослини від шкідників. Рослини кави синтезують кофеїн із нуклеозиду ксантозину шляхом чотирьох послідовних реакцій, показаних на Фігурі 1. Див. Suzuki, T., Ashihara, H. і Waller, G.R., *Phytochemistry* 31: 2575 (1992). Перша стадія синтезу - це метилування нуклеозиду ксантозину S-аденозилметіоніном, що каталізується ферментом ксантозин-М⁷-метилтрансферазою (ХМТ). Продукт реакції, 7-метилксантозин, гідролізується до 7- метилксантину (видаляється рибоза), і піддається подальшому метилуванню з одержанням теоброміну та кофеїну. Очікується, що перериванням цієї послідовності реакцій можна запобігти синтезу кофеїну.

Отже, стратегія вибіркового видалення кофеїну з кавових зерен полягає в запобіганні синтезу особливих ферментів у ході біосинтезу кофеїну. В одній реалізації цей винахід стосується генетичної зміни рослин кави з метою усунення синтезу ХМТ. У кращій реалізації синтез ХМТ пригнічується в результаті трансформування рослин кави за допомогою послідовності ДНК, яка кодує транскрипцію матричної РНК (мРНК), що є антисмисловою до мРНК, яка кодує експресію ХМТ. Винахід можна узагальнити для одержання напоїв і продуктів харчування, що не містять кофеїну, які включають чай, какао та інші напої й продукти на основі шоколаду.

Очищені білки, послідовності ДНК, що кодують експресію, і молекули рекомбінантної ДНК, включаючи трансформовані при їх використанні хазяйські клітини для трансформування рослин кави з метою пригнічення експресії кофеїну складають суть даного винаходу. Послідовності ДНК і молекули рекомбінантної ДНК характеризуються тим, що вони кодують експресію ферменту ксантозин-N⁷-метилтрансферази (ХМТ), який каталізує першу стадію синтезу кофеїну в рослинах кави. Забезпечується основна послідовність ДНК і передбачена послідовність амінокислот ХМТ.

Рослини кави трансформуються за допомогою молекул ДНК, що кодують транскрипцію мРНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію принаймні одного ферменту у процесі біосинтезу кофеїну. Антисмислова РНК зв'язується з ХМТ мРНК, інактивуючи, таким чином, мРНК, що кодує першу стадію біосинтезу кофеїну. У результаті цього трансформовані рослини кави не здатні синтезувати кофеїн, причому на інші сторони їх метаболізму це не впливає.

Фігура 1 є схемою процесу біосинтезу кофеїну у каві арабіка (*Coffea arabica*).

Фігура 2 є фотографією поліакриламідного гелю після електрофорезу очищеної ксантозин-N⁷-метилтрансферази у присутності додецилсульфату натрію (SDS PAGE), забарвленого сріблом.

Фігура 3 представляє собою хроматограму елюювання триптичних фрагментів очищеної ксантозин-N⁷-метилтрансферази після розділення за допомогою ВЕРХ.

Фігура 4 представляє собою олігонуклеотидні праймери, які використовуються для скринінга кДНК із бібліотеки кДНК, що кодує ксантозин-N⁷-метилтрансферазу.

Фігура 5 представляє собою основну послідовність кДНК, що кодує ксантозин-N⁷-метилтрансферазу.

Фігура 6 представляє собою передбачену послідовність амінокислот ксантозин-N⁷-метилтрансферази.

Для кращого розуміння цього винаходу пропонується наступний докладний опис, у якому використовуються терміни:

Нуклеотид - Мономерна одиниця ДНК або РНК, що складається з вуглеводу (пентози), залишку фосфорної кислоти та азотистої гетероциклічної основи. Основа зв'язана з вуглеводною частиною через глікозидний атом вуглецю (1^й атом вуглецю пентози), ця комбінація основи й вуглеводу називається нуклеозидом. Основа характеризує нуклеотид. Чотири основи ДНК - це аденін ("А"), гуанін ("G"), цитозин ("C") і тимін ("T"). Чотири основи РНК - це А, С, G і урацил ("U").

Послідовність ДНК - Лінійний ланцюг нуклеотидів, зв'язаних один з одним фосфодієфірними зв'язками між 3'

і 5' атомами вуглецю сусідніх пентоз.

Кодон - Послідовність ДНК із трьох нуклеотидів (триплет), що кодує через мРНК амінокислоту, сигнал початку трансляції або сигнал термінації трансляції. Наприклад, триплети нуклеотидів ТТА, ТТГ, СТТ, СТС, СТА і СТ кодують амінокислоту лейцин (Leu), TAG, TAA і TGA є сигналами термінації трансляції, ATG є сигналом початку трансляції і також кодує амінокислоту метіонін (Met).

Поліпептид - Лінійна послідовність амінокислот, зв'язаних між собою пептидними зв'язками між аміно- і карбоксильними групами сусідніх амінокислот.

Геном - повна ДНК клітини або вірусу. Він включає структурний ген, що кодує поліпептиди речовини, а також сайти промотору, початку та термінації транскрипції й трансляції.

Ген - Послідовність ДНК, що кодує через її матричну РНК (мРНК) послідовність амінокислот, характерних для специфічного поліпептиду.

Транскрипція - Процес одержання мРНК із гену або послідовності ДНК.

Трансляція - Процес одержання поліпептиду з мРНК.

Експресія - Процес одержання поліпептиду при використанні гену, або послідовності ДНК. Поєднання транскрипції й трансляції.

Плазміда - нехромосомна дволанцюгова послідовність ДНК, що включає інтактний "реплікон", такий, що плазміда реплікується у клітині-хазяїні. Коли плазмиду вводять в одноклітинний організм, характеристики цього організму можуть змінитися або бути трансформовані в результаті введення ДНК плазміди. Наприклад, плазміда, що несе ген стійкості до тетрацикліну (TETR), трансформує клітину, раніше чутливу до тетрацикліну, у клітину, стійку до нього. Клітина, трансформована плазмідом, називається "трансформантом".

Фаг або Бактеріофаг - бактеріальні віруси, які, здебільшого, складаються з послідовностей ДНК, що розміщені у білковій оболонці ("капсид").

Клонуючий вектор - Плазміда, фаг ДНК, косміда, або інша послідовність ДНК, здатна реплікуватися у клітині-хазяїні, що характеризуються одним або невеликою кількістю сайтів впізнання ендонуклеази, у яких такі послідовності ДНК можуть бути розрізані визначеним способом без втрати необхідної біологічної функції ДНК, наприклад, реплікації, синтезу білків оболонок або втрати промотору, або сайтів зв'язування, і які містять маркер, що підходить для ідентифікації трансформованих клітин, наприклад, стійкості до тетрацикліну або ампіциліну. Клонуючий вектор часто називають вектором.

Клонування - Процес одержання популяції організмів або послідовностей ДНК, узятих від одного з таких організмів, або послідовність безстатевої репродукції.

Молекула рекомбінантної ДНК або гібридна ДНК - молекула, що складається із сегментів ДНК від різних генів, які з'єднані кінець-у-кінець поза живою клітиною і здатні підтримуватися живими клітинами.

кДНК - Ланцюг ДНК, комплементарний мРНК, що кодує специфічний поліпептид.

Хоча стратегія одержання кави, яка не містить кофеїну, може бути поширена на інші ферменти у процесі біосинтезу кофеїну у каві й інших рослинах, що виробляють кофеїн, у даній кращій реалізації винаходу пригнічують експресію першого ферменту у процесі біосинтезу кофеїну - ксантозин-ІІІ⁷-метилтрансферазу (ХМТ). Хоча роль ХМТ у синтезі кофеїну була показана методами радіоактивних міток, дотепер цей фермент не був очищений і не була визначена його амінокислотна послідовність. Тому цей винахід включає очищену ХМТ. Також винахід включає амінокислотну послідовність триптичних фрагментів, виділених з очищеної ХМТ.

Були синтезовані кДНК-зонди, що базуються на фрагментах послідовностей амінокислот, отриманих із зразків очищеного ферменту, і фрагмент гену був ампліфікований, із використанням техніки ПЛР. ПЛР-продукти використовувалися для скринінга бібліотеки кДНК, синтезованої з мРНК молодих листків, для того, щоб ідентифікувати транскрипти, що кодують ХМТ. Позитивні транскрипти з'єднувалися в послідовність і було отримано близько 90% гену, який кодує ХМТ.

ДНК, яка кодує експресію ХМТ, вводили у трансформуючий вектор рВІ-121, який включав ген стійкості до канаміцину. Успішне введення цього вектора у клітини рослин буде продемонстроване появою стійкості до антибіотиків. Такі конструкції використовували для трансформування соматичних ембріонів кави у тканинній культурі. Потім із трансформованих ембріонів вирощували нові рослини кави, які не виробляли кофеїну. Натуральну каву, що не містить кофеїну, готували з обсмажених перемелених плодів цих нових рослин.

Більш конкретно, свіжу тканину листів із молодих листків кави арабіка (*C. arabica*) вимочували та виділяли з неї білок. Очищені на колонці екстракти випробували на ферментну активність шляхом контролю метилування ксантозину, використовуючи як субстрат мічений С¹⁴ S-аденозилметіонін. Продукт реакції ідентифікували як 7-метилксантозин шляхом порівняння міграції міченого продукту реакції з міграцією 3-метилксантину, 7-метилксантину, 8-метилксантину, 7-метилксантозину, ксантину й ксантозину в кожній з чотирьох хроматографічних систем.

Чистота білкових ізолятів визначалася за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS 'PAGE) і двомірного електрофорезу в гелі. Забарвлення сріблом двомірних SDS PAGE гелей показало присутність дублету з ферментною активністю ХМТ, із молекулярною вагою 36-37 кілодальтонів (кД), як показано на Фігурі 2. Потім кожний білок відокремлювали за допомогою ізоелектричного фокусування. Отримані дані показали наявність ізоферментів ХМТ, що можливо було результатом посттрансляційної модифікації білка, або результатом присутності родини генів, які кодують ферменти ХМТ.

Дублет, що спостерігається у SDS PAGE гелях, використовували для секвенування білка. Очищену ХМТ піддавали частковому триптичному ферментативному розщепленню для одержання фрагментів для подальшого аналізу; за допомогою ВЕРХ одержали три піки, що розрізняються. Секвенування проводили в лабораторії структури білків Університету Каліфорнії (Protein Structure Laboratory of the University of California,

Davis) із використанням автоматичної деградації Едмана (Edman, P. And Begg, G., Eur.J. Biochem. 1:80). Були отримані дві унікальні послідовності, що використовувалися для конструкції праймерів для синтезу зондів. РНК виділяли з листків кави. Потім очищали мРНК, що містить полі(А+)-послідовності. Одержували бібліотеку кДНК із полі(А+) мРНК, використовуючи зворотну транскриптазу. Одержували дволанцюгову ДНК, використовуючи полімеразу I ДНК, і виділяли осадженням. кДНК фракціонували та вводили у фаг для ампліфікації. Проводили скринінг бібліотеки кДНК за допомогою синтезованого ПЛР зонду, отриманого з використанням праймерів, що базуються на послідовності ДНК, передбаченої з амінокислотної послідовності очищеної ХМТ. Була ідентифікована кДНК, яка продукує клон, що містить усі послідовності, які кодують ХМТ.

кДНК, що відповідає гену, який кодує ХМТ, використовується для трансформування ембріональних рослин кави. Плазмідна рВІ-121 використовується як вектор для трансформації. Послідовності, які відповідають ДНК, яка кодує експресію ХМТ, вводили у плазмиду у інвертованій орієнтації поруч із 35S промотором вірусу мозаїки цвітної капусти. Отримана в результаті транскрипції мРНК, буде комплементарною мРНК, що кодує амінокислотну послідовність ХМТ. Повні конструкції ампліфікуються в бактеріальних клітинах-хазаях. Хазайські клітини руйнуються й ампліфікований вектор приєднується до колоїдних частинок золота. Частинки золота з приєднаними векторами вбудовували у протопласти рослин кави шляхом обробки клітин цими частинками з великою швидкістю, як описано в патентній публікації США 5,107,065. Успішно трансформовані рослини ідентифікували за стійкістю до антибіотиків. Трансформовані рослини не виробляли кофеїну.

ПРИКЛАДИ

А. Очищення ксантозин-N⁷-метилтрансферази з листків кави арабіка (*C. arabica* L. cv Guatemalan).

Тканину молодих листків, довжиною менше 5мм (еквівалентних стадії В3 (Frischknecht, P.M., Ulmer-Dufek, J. And Baumann, T.W. (1986) *Phytochemistry* 25:613). збирали з дерев, вирощених на дослідницькій станції (Waimanalo) Гавайського Університету, Оаху, Гавайї. Листя негайно поміщали в рідкий азот і зберігали до використання при температурі -70°C. Усі необхідні процедури проводили при температурі 4°C, якщо не буде вказано інше. Тканину листя розм'якушували у ступці під рідким азотом і після заморожування поміщали у побутову кавомолку і перемелювали протягом 30 секунд із невеликим шматочком льоду. Здрібнену тканину листків поміщали у склянку, що містить 1,5 літра крижаного 80%-ного ацетону, 5мм тіосечовини і 12,5мм Р-меркаптоетанолу. Після перемішування на магнітній мішалці протягом 45 хвилин тканину відфільтровували у вакуумі на воронці Бюхнера через фільтрувальний папір Whatman №1. Потім тканину промивали 2,5 літрами крижаного 80%-ного ацетону, що містить тіосечовину і В-меркаптоетанол, як описано вище, сушили на повітрі протягом 20 хвилин і ліофілізували протягом 48 годин.

Отриманий порошок змішували в міксері з 400мл екстракційного буфера (ЕБ) (0,1 М PIPES [pH 7,0], 0,5мм Na₂EDTA, 0,5мм Na₂EGTA, 5% аскорбінової кислоти, 5мм дитіоетанолу [DTT], 5мм тіосечовини, 12мм L-цистеїну HCl, 1% поліетиленгліколю (PEG) 20,000, 0,1мм фенілметилсульфонілфториду [PMSF], і 20 г полівінілполіпіролідону [PVPP]). Суміш перемішували протягом 10 хвилин із середньою швидкістю, розливали по центрифужним пробіркам на 250мл і центрифугували зі швидкістю 23,000 об/хв. на центрифугу GSA (Du Pont-Sorvall).

До 350мл отриманого супернатанту протягом 30 хвилин при перемішуванні поступово додавали 78,86 г сульфату амонію (AS) до одержання 40%-ного розчину, причому резервуар поміщали у баню з льодом. Потім суміш знову розливали по центрифужних пробіркам на 250мл і центрифугували протягом 30 хвилин із швидкістю 23,000 об/хв., як описано вище. 350мл отриманого супернатанту завантажували в хроматографічну колонку Маско-Ргер (Bio-Rad) об'ємом 40мл із метил-гідрофобною взаємодією зі швидкістю 2,5мл/хв. Усі фракції перевіряли на білок шляхом абсорбції при 280 нм. Колонку спочатку врівноважували буфером, що містить 1,7 М сульфату амонію, 20мм біс-Трис-пропану, (pH 6,8) і 5мм DTT до встановлення базової лінії біля нуля. Потім через колонку пропускали буфер, що містить 10мм гідроксиметиламінометану (Трису) (pH 7,0), 5мм DTT, 1мм MgCl₂. Перші 15мл елюату відкидали, а 200мл елюату, що залишилися, пропускали самотечею через колонку об'ємом 100мл, заповнену афінним гелем Affi-Gel Blue (100-200, Bio-Rad), із матрицею якого ковалентно зв'язаний барвник Cibacron blue F3GA. Гель врівноважували буфером, що містить 10мм Трису (pH 7,0), 5мм DTT, 1мм MgCl₂ доти, поки базова лінія не встановлювалася біля нуля. Потім адсорбовані білки елюювали буфером, що містить 10мм Трису (pH 7,0), 5мм DTT і 1,5мм хлориду натрію.

До 142мл елюату з колонки з гелем Affi-Gel Blue додавали невеликими порціями 31,8 г сульфату амонію до концентрації 1,7 М при перемішуванні протягом 30 хвилин, причому резервуар з елюатом була поміщена у баню з льодом. Потім суміш центрифугували у центрифужних пробірках на 250мл протягом 30 хвилин із швидкістю 23,000 об./хв., як описане вище, і супернатант завантажували в колонку з феніл-сефарозою (FPLC Phenyl-Sepharose column XK 26/20 (Pharmacia)) при 23°C. Колонку врівноважували буфером, що містить 1,7 М сульфату амонію, 20мм біс-Трис-пропану, (pH 6,8) і 5мм DTT. Після встановлення базової лінії біля нуля з колонки елюювали білки протягом 40 хвилин при зворотному градієнті концентрації буфера від 1,7 М до 0 М сульфату амонію зі швидкістю 5мл/хв., збираючи фракції по 1 хвилині. Елюент із 0 М сульфату амонію містив 10мм Трису (pH 7,0), 5мм DTT, 1мм MgCl₂.

Випробування активності зібраних фракцій показало, що найбільшу ферментну активність ксантозин-N⁷-метилтрансферази проявили фракції від 49 до 54. Ці фракції об'єднували і отриману кількість об'ємом 30мл: пропускали самотоком через колонку з ATP-агарозою (ATP-agarose (Sigma Chemicals A2767)) при 4°C. Колонку промивали буфером для врівноважування, який містить 10мм Трису (pH 7,0), 5мм DTT, 1мм MgCl₂. Після встановлення базової лінії колонку промивали 20мл буфера для врівноважування, який містить 100 мкМ ксантозину, а потім ще 40мл буфера для врівноважування. Обидва елюати поєднували й завантажували в колонку Моно-Р HR 5/20 FPLS (Pharmacia), врівноважену буфером, що містить 25мм біс-Трису (pH 6,0) і 9%

бетаїну при 23°C. Після встановлення базової лінії колонку промивали 100мл полібуфера 74 [Polybuffer 74 (10мл:90мл H₂O) (pH 4,0) (Pharmacia)] і 9% бетаїну зі швидкістю 1мл/хв. Пробірки для збирання містили 100мкл 0,5 М трицину (pH 7,0) і 50мм DTT для одержання кінцевої концентрації у 1мл 50мм трицину (pH 7,0) і 5мм DTT у фракціях, зібраних за 1 хвилину. Це ефективно стабілізувало заключну кислотність середовища для білків, елюйованих при слабко кислому pH із Моно-Р колонки. Найбільшу активність ксантозин-М⁷-метилтрансферази у пробірках для збирання спостерігали для фракцій 15 і 16 після градієнтного елюювання з колонки з pH 5,42 і 5,35 відповідно. Важливо не заморожувати зразки білків на будь-якій стадії очищення, тому що це негативно впливає на активність ксантозин-Ы⁷-метилтрансферази.

В. Визначення ферментної активності.

100мкл стандартної суміші для аналізу містили 50мм трицину (pH 7,0), 1200мкл ксантозину, 5мм DTT, 7,5мкл 8-аденозил-і--[метил-¹⁴C]-метіоніну (SAM) (60 мКі/ммоль; DuPont NEN), і 1мм Na₂EDTA. Реакційну суміш (50мкл без ферменту) витримували 10 хвилин при 25°C, потім ініціювали реакцію додаванням 50мкл розчину ферменту і залишали на 1 годину при 25°C. Після цього відбирали три аліквоти реакційної суміші по 30мкл і обробляли 8мкл 0,6 М розчину хлорної кислоти (HClO₄). Аналогічні процедури проводили з контрольними пробами (із нульовим часом реакції) для одержання первинного значення ферментної активності. Суміш центрифугували на мікроцентрифугу 5 хвилин і додавали до 19мкл супернатанту 1,0мкл 33 М 7-метилксантозину. Ці суміші наносили на хроматографічний папір Whatman No. 1 і піддавали хроматографії у розчині н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:1). Положення 7-метилксантози визначали по її блакитній флуоресценції у короткохвиловому УФ-випромінюванні. Цю область вирізували з хроматограм і визначали радіоактивність вирахуванням сцинтиляцій, використовуючи 3мл сцинтиляційної рідини (Scinti-verse scintillation fluid (Fisher Scientific)). Точність розрахунків складала 74,7 %. Значення фону і неспецифічної радіації, визначені для 7-метилксантозину в контрольних експериментах, відраховувалися.

С. Ідентифікація продукту реакції.

Сайт метилування ксантинового кільця ідентифікували шляхом гідролізу вуглеводу продукту реакції метилування ксантозину і розділення в чотирьох різних хроматографічних системах. Продукт із двох 100мкл проведених реакцій, як описано вище, що містить 6мкл 33мм 7-метилксантозину як носій, наносили на хроматографічний папір Whatman No. 1. Хроматографували в розчині н-бутанол-оцтова кислота-вода (л-ВиОН-НОАс-Н₂O) (4:1:1). Ділянки хроматограми, що відповідають метильованому ксантозину, визначали, як описано вище, розрізали на маленькі шматочки, поміщали в стерильні пробірки і витримували у 35мл деіонізованої води при 37°C протягом ночі при струшуванні. Екстракт фільтрували через два шари тканини, 0,22 мкм фільтр і ліофілізували. Висушений екстракт розчиняли у 1,0мл деіонізованої води, поміщали в скляний резервуар та ліофілізували. Потім зразок розчиняли в 400мкл 1,0 М HCl і витримували протягом 1 години при 100°C. Продукт ферментативного розщеплення ліофілізували, розчиняли в 400мкл 3мм 7-метилксантину і знову ліофілізували. Потім цей продукт розчиняли у 40мкл деіонізованої води і 10мкл розчину, хроматографували в кожній з чотирьох різних систем. 1-метилксантин, 3-метилксантин, 7-метилксантин, 8-метилксантин, 7-метилксантозин, ксантин і ксантозин наносили на кожну хроматограму для порівняння. Використовували наступні хроматографічні системи: (л-ВиОН-НОАс-НгО) (4:1:1) на папері Whatman No. 1 і, або ізоаміловий спирт-вода-ацетонітрил (41:4:5), етанол-вода (4:1), або tef-BuОН-НОАс-Н₂O (4:1:1) на C8 тонкошарових пластинах (Whatman KC18F). Після висушування на хроматограми напилювали En ³Hance (DuPont NEN), знову висушували й експонували протягом 30 днів на попередньо опроміненій рентгенівській плівці (Fuji RXgcu) при -70°C.

Д. Ідентифікація білків за допомогою гель-електрофорезу.

Екстракти, отримані як описано вище, використовували для одомірного (1D) електрофорезу (SDS-PAGE) у міні гелях (основний гель: 12,5% акриламід, 0,8% метилен-біс-акриламід; гель для концентрації: 7,5% акриламід, 0,21% метилен-біс-акриламід),

змішуючи їх із буфером Лемлі для зразків (Laemmli, U.K., Nature 227:680 (1970)), і для двомірного (2D) ізоелектрофокусування (IEP)/електрофорезу (SDS-PAGE) у міні гелях за допомогою модифікованого способу O'Farrell і ін. (O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell P.H., Cell 12:1133 (1977)). Двомірний електрофорез проводили, осаджуючи білки 50 об'ємами 10% етанолу протягом 1 години і далі, розчиняючи їх у буфері для зразків для ізоелектрофокусування (IEF), що містить 5% амфолінів (1:1 (по об'єму), pH 3-10: pH 5-7, LKB-Pharmacia). Співвідношення об'ємів екстракту білків і IEF буфера для зразків підтримували на рівні 1:2 для впевненості в тому, що складові буфера, які залишилися після хроматографії, не будуть заважати IEF. Рівні кількості білкових зразків (<20мкг) наносили у трубки попередньо сфокусованих гелей (8,8% акриламід, 1,6% метилен-біс-акриламід), що містять 5% амфолінів, як описано вище. Гелі фокусували протягом 10 000 Вольт-годин і додатково 2 години при 1 000 Вольт. Гелі після фокусування розрізали на ділянки по 5мм і обробляли 24 години у 0,5мл 100мМ розчину CaCl₂, потім визначали pH сегментів. Виходячи з цього аналізу, розраховували градієнт pH IEF гелю, що знаходиться у діапазоні від 4,4 до 6,0.

Гелі у трубках для SDS PAGE промивали водою і три рази (кожний по 10 хвилин) буфером Лемлі для зразків. Потім їх поміщали у верхню частину SDS PAGE гелів (основний гель: 12,5% акриламід, 0,8% метилен-біс-акриламід; гель, що концентрує: 7,5% акриламід, 0,21% метилен-біс-акриламід), закріплювали 3% агарозою у буфері Лемлі для зразків. Білки забарвлювали сріблом. У 1D гелях фракція 16 Моно-Р, що має найбільшу ферментну активність, показала тільки присутність дуплету після забарвлення сріблом (Фігура 2). Була визначена молекулярна вага цих білків - приблизно 37,6 і 36,1 кД. У 2D гелях кожний білок розділявся на дві плями. Ізоелектрична точка (IP) більш кислотного білка мала середнє значення по декільком гелям 5,2, а

більш основного - 5,3. їх молекулярна вага, проте, тепер мала середнє значення 43,5 кД, із вищими й нижчими пептидами, зв'язаними один з одним. Отже, є різниця між 1D і 2D гелями при визначенні молекулярної ваги. Однакова міграція всіх цих чотирьох пептидів у Моно-Р колонках, 1D і 2D гелях показує, що вони є ізоферментами, які можуть модифікуватися після трансляції. З іншого боку, вони можуть бути продуктами родини генів, що мають невелику різницю один від одного у структурі, яка веде до одержання різних ізоферментів.

Е. Секвенування білків.

Оцінка кількості білка методом Лоурі (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193:265 (1951)) для фракції 16 Моно-Р показала, що в 1мл-фракції міститься усього 100мкг білка. Згідно з нашими даними при таких низьких концентраціях значення Лоурі можуть відрізнятися від дійсних значень. Щоб уникнути цього, ми вирішили використовувати речовинну частину цих фракцій для секвенування білка. 900мкл фракції 16 Моно-Р, що містить 90мкг білка, поміщали у стерильні мікроцентрифужні пробірки на 1,5мл і додавали 216мкл 100%-ної трихлороцтової кислоти (TCA). Після перемішування пробірки витримували протягом ночі на льоду, потім центрифугували зі швидкістю 14 000 об/хв. у мікро центрифугу 30 хвилин при 4°C. Супернатант видаляли відсмоктування, а осад промивали двічі 1мл 75%-ного етанолу, причому кожне промивання супроводжувалося центрифугуванням. Потім осад висушували при обертанні у вакуумній центрифугу протягом 1 хвилини. До осаду додавали 20мкл буфера Лемлі для зразків, кип'ятили на водяній бані протягом 5 хвилин і центрифугували 1 хвилину. Потім пробірки охолоджували до 23 °C і всю кількість завантажували на одну лінію 12,5%-ного 1D гелю. Після закінчення електрофорезу білки забарвлювали 0,1% водним розчином Coomassie R-250, що містить 50% етанолу і 10% оцтової кислоти, (ваг. %:об.:%:об.%) і промивали. Дублет із 37,6 і 36,1 кД, отриманий при забарвленні сріблом, також спостерігався і для гелів, забарвлених Coomassie R-250. Ділянку гелю, що містить цей дублет, вирізували й використовували для секвенування білка методом автоматичної деградації Едмана.

Секвенування білка проводили в лабораторії структури білків Університету Каліфорнії (Protein Structure Laboratory of the University of California, Davis) стандартним способом. Зразок гелю, що включає дублет, промивали 4 рази 15мл води при обережному струшуванні для видалення оцтової кислоти і SDS, що залишилися після попередніх операцій. Далі, зразок гелю розрізали лезом бритви на шматочки площею 2мм² і поміщали у центрифужні пробірки на 1,5мл. Шматочки гелю піддавали дегідратації у вакуумній центрифугу протягом 2 годин, поки вони не прилипали до пробірки. Потім додавали 30мкл гідратуючого буфера (0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,05% SDS), і визначали pH, наносячи 0,5мкл розчину на pH папір, при цьому його значення дорівнювало 8,0. Додавали фермент перетравлювання Lys-C (0,2мкг), отриманий з *Achromobacter luteus* (Wako), і таку кількість гідратуючого буфера, щоб цілком повністю гідратувати шматочки гелю і залишити деяку кількість буфера зовні. Суміш витримували при 30°C протягом ночі, після цього супернатант переносили в чисту, стерильну центрифужну пробірку для зберігання. До шматочків гелю, що залишилися, додавали воду так, щоб вона їх покривала, і витримували при температурі 30°C протягом 2 годин. Супернатант переносили у пробірку для зберігання, як описано вище. Подібне промивання повторювали ще один раз і об'єднували із супернатантами, отриманими після перших двох промивань. Потім шматочки гелю заливали розчином, що містить 0,1% трифтороцтової кислоти (TFA) у 80%-ному ацетонітрилі і витримували протягом 1 години при 30°C. Супернатант збирали та поєднували з раніше отриманими супернатантами. Останнє промивання повторювали ще один раз, і зібрані разом супернатанти висушували у вакуумі.

Висушені продукти триптичного розщеплення розчиняли в 6 M гуанідин-HCl, 0,4 M Трису (pH 8,2), pH отриманого розчину визначали нанесенням 0,5мкл на pH папір. Додавали 1мкл DTT і витримували продукт 45 хвилин при 50°C. Після охолодження до кімнатної температури додавали 2мкл 500мм йодацетаміду і витримували продукт протягом 15 хвилин при 23°C. Потім додавали 72мкл води до кінцевої концентрації 1,5 M гуанідину і 0,1 M Трису. Потім зразки центрифугували 5 хвилин із швидкістю 14 000 об/хв. у мікроцентрифугу та обережно переносили супернатант у нову центрифужну пробірку. До осаду додавали 25мкл 0,1% TFA і центрифугували, як описано вище. Супернатант поєднували із супернатантом, отриманим на попередній стадії.

Фрагменти, отримані в результаті триптичного розщеплення, розділяли на капілярній колонці C18 1мм x 10 см методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), застосовуючи лінійний градієнт від 5% розчинника А (0,1% TFA) до 70% розчинника В (0,075% ацетонітрилу) за 90 хвилин із швидкістю потоку 100мкл/хв. УФ-детектор був установлений на рівні 210 нм із шкалою від 0 до 0,1 А. Наявність індивідуальних піків відображує присутність різних пептидів, як показано на Фігурі 3. Як контрольні точки використовувався вихідний SDS PAGE гель, що не містить білка, з яким проводили ті ж процедури ферментативного розщеплення. Піки, забарвлені на Фігурі 3, були присутні на хроматограмах і контролю, і зразка. З піки, позначені літерами А, В і С, піддавалися автоматичній деградації Едмана. Два піки (А і В) належали послідовностям, що представляють один фрагмент білка (Фігура 2, фрагменти А і В). Третій пік (С) належав іншій послідовності. (Фігура 2, фрагмент С).

Ф. Синтез олігонуклеотидних праймерів ксантозин-N⁷- метилтрансферази. Хімічний синтез 20-ти мірних праймерів для двох амінокислотних послідовностей, що

проводився шляхом ферментативного розщеплення ксантозин-N⁷-метилтрансферази, був здійснений Midland Certified Reagent Company. Вибрані ділянки й фрагменти мали мінімальну виродженість нуклеїнових кислот і в них були відсутні амінокислоти, що мають велику надмірність генетичного коду. Було неможливо синтезувати більше одного праймера для одного фрагмента, щоб він включав усі можливі альтернативні комбінації кодонів. Більш того, ми синтезували праймери, комплементарні кодуєчому ланцюгу послідовностей ДНК, які кодували амінокислотну послідовність. Виродженість нуклеотидів у третьому положенні усували використанням інозину в цих положеннях. Якщо виродженість нуклеотидів була двократною, то обидва

нуклеотиди включали в синтез праймера (Фігура 3).

G. Екстрагування РНК із молодих листків кави стадії В3.

Усі операції у ході екстракції здійснювали стерильно, при відсутності РНКаз і здійснювалися з використанням води, обробленої діетилпірокарбонатом (DEPC). Усі стадії центрифугування проводили при 4°C, якщо не було вказане інше.

Молоді листки кави стадії В3 збирали та зберігали, як описано вище. Загальну РНК виділяли з 100 г тканини цих молодих листків, розм'якшеної під рідким азотом, яку потім негайно переносили в охолоджену побутову кавомолку і перемелювали з невеликим шматочком льоду. Здрібнену тканину листів поміщали в 200мл гомогенізуючого буфера, що містить 100мМ Трис-НСl (рН 9,0), 200мМ NaCl, 15мМ EDTA, 0,5% саркозилу і 100мМ В-меркаптоетанолу, доданого безпосередньо перед використанням. До цього додавали 200мл фенолу і 40мл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт: (24:1, об.%). Потім тканину гомогенізували у резервуарі на крижаній бані протягом 2 хвилин з високою швидкістю у гомогенізаторі Polytron. Відразу після гомогенізації додавали 14мл 3М ацетату натрію (рН 4,0) перемішували у гомогенізаторі ще 1 хвилину. Гомогенат витримували 15 хвилин на льоду, розливали у дві центрифужні поліпропіленові пробірки на 250мл і центрифугували зі швидкістю 16 000 об./хв. протягом 10 хвилин на центрифугі GSA (Du Pont-Sorvall). Водну фазу (верхній шар) переносили в нові центрифужні поліпропіленові пробірки на 250мл і додавали рівний об'єм ізопропанолу.

Цю суміш витримували при -20°C протягом ночі і центрифугували зі швидкістю 10000 об./хв. 10 хвилин, щоб виділити осаджену РНК.

Осад РНК промивали 70% етанолом і центрифугували 5 хвилин із швидкістю 10000 об./хв. Етанол декантували, осад висушували у вакуумі протягом 5 хвилин. Потім осад суспендували у 15мл деіонізованої води. Суспензію РНК переносили у стерильну центрифужну пробірку з кришкою на 40мл і видаляли нерозчинні матеріали центрифугуванням протягом 5 хвилин із швидкістю 10 000 об./хв. Супернатант переносили у нову центрифужну пробірку з кришкою на 40мл і додавали 5мл 8 М LiCl для одержання заключної концентрації LiCl 2 М. Пробірку витримували протягом ночі при 4°C і виділяли РНК центрифугуванням протягом 10 хвилин із швидкістю 14 000 об./хв. Осад РНК промивали 70% етанолом, центрифугували 5 хвилин із швидкістю 10 000 об./хв. і швидко сушили у вакуумі. Потім осад суспендували в 5мл води, обробленої DEPC і центрифугували 5 хвилин із швидкістю 10 000 об./хв. для видалення нерозчинних матеріалів. Супернатант переносили в 4 стерильні мікроцентрифужні пробірки на 1,5мл і зберігали на льоду. Аналіз 10мкл розчину загальної РНК на спектрофотометрі Shimadzu UV 160U у діапазоні від 230 до 330 нм показав, що кількість отриманої РНК складає 42,8 мг. Пробірки з РНК зберігали при -70°C.

Н. Виділення полі (А+) мРНК із загальної РНК.

Після одержання загальної РНК із неї виділяли полі (А+) РНК (мРНК), використовуючи набір реактивів для ізоляції мРНК PolyATtract II (Promega Corporation). Аліквоту 600мкл загальної РНК, що містить 5,1 мг наливали у пробірку вищезгаданого набору і доводили об'єм до 2,43мл водою, вільною від РНКаз. Після нагрівання при 60°C протягом 10 хвилин додавали 10мкл 50 пікомоль/мл біотинільованого оліго (dT) і 60мкл 20 x SSC буфера (175,3г/л NaCl, 88,2г/л цитрату натрію, рН 7,0) і повільно охолоджували до кімнатної температури приблизно 30 хвилин. Аліквоту парамагнітних частинок стрептовідину промивали 3 рази 0,5 X SSC (1,5мкл на промивання) і суспендували у 0,5мл 0,5 x SSC. Розчин РНК, що містить біотинільовані оліго(dT) змішували з промитими парамагнітними частинками стрептовідину. Після витримування протягом 10 хвилин при кімнатній температурі парамагнітні частинки разом із захопленою мРНК осаджували на стінках пробірки за допомогою магніту. Супернатант видаляли, частинки промивали 4 рази 0,1 X SSC (1,5мл на промивання). Виділяли мРНК, суспендуючи частинки в 1,0мл води, вільної від РНКаз, і потім зливаючи воду, після того, як частинки осаджувалися на стінках пробірки. Отриману воду, по 500мкл за 1 раз, наливали у стерильні мікроцентрифужні пробірки на 1,5мл. Після додавання 0,1 об'єму 3М ацетату натрію (50мкл на пробірку) виділяли мРНК шляхом осадження рівним об'ємом ізопропанолу (550мкл на пробірку). Пробірки витримували протягом ночі при -20°C і потім центрифугували 30 хвилин із швидкістю 14000 об./хв. при 4°C. Осад промивали 500мкл 75%-ного крижаного етанолу і центрифугували. Етанол декантували й осад сушили у вакуумі. мРНК розчиняли в 60мкл стерильної, вільної від нуклеази води, обробленої DEPC. Для аналізу мРНК відбирали 15мкл розчину і проводили його, як описано для загальної РНК. Із 5 мг загальної РНК було отримано приблизно 9,6мкг мРНК. І. Конструювання бібліотеки кДНК.

Перший і другий ланцюги кДНК синтезували з використанням набору реактивів для синтезу ZAP-cDNA (Stratagene). 4 мг мРНК у 25мкл води витримували при 65°C 5 хвилин. Додавали 3мкл 100мМ метилртуті і витримували при кімнатній температурі 10 хвилин. Додавали 4мкл 700мМ В-меркаптоетанолу і продовжували реакцію ще 5 хвилин. До денатурованої мРНК додавали 5мкл 10 x буфера першого ланцюга, 5мкл 10мМ DTT 3мкл суміші нуклеотидів (по 10мМ кожного dATP, dGTP, TTP і 5-метил-clCTP), 2мкл 1,4 мг/мл лінкер-праймера,

Додавали 1мкл блоку РНКаз і 5мл води. Реакцію проводили при кімнатній температурі 10 хвилин для приєднання праймера до мРНК, потім додавали 2,5мкл 20 од./мл M-MuLV зворотної транскриптази. 5мкл цієї реакційної суміші переносили у пробірку, що містить 0,5мкл 800 Кі/ммоль [A-³² P]dCTP (DuPont NEN). Обидві реакції здійснювали при 37°C 1 годину. Цю реакційну суміш із радіоактивною міткою заморожували при -20°C для подальшого аналізу у гелі.

До 45мкл основної реакційної суміші додавали 40мкл буфера другого ланцюга, 15мкл 100 мМ DTT, 6мкл суміші нуклеотидів (10 мМ dATP, dGTP, TTP і 26мМ dCTP), 268,3мкл води і 2мкл 800 Кі/ммоль [A-³² P]dCTP. Після перемішування додавали 4,5мкл 1 од./мкл РНКазі Н і 19,2мкл 5,2 од./мкл полімерази ДНК E. coli і витримували 2,5 години при 16°C. Потім реакційну суміш екстрагували сумішшю фенол:хлороформ (1:1), фази

розділяли центрифугуванням. Водну фазу переносили в нову пробірку і екстрагували хлороформом. Цю операцію повторювали двічі. Дволанцюгову кДНК виділяли осадженням протягом ночі при -20°C після додавання 33,3мкл 3М ацетату натрію і 867мкл 100%-ного етанолу. Осад відокремлювали центрифугуванням на мікроцентрифузі при 4°C протягом 60 хвилин. Осад промивали 1мкл 80%-ного етанолу і центрифугували при кімнатній температурі з максимальною швидкістю на мікроцентрифузі. Супернатант видаляли, осад сушили у вакуумі і розчиняли в 45мкл води. Відбирали 3мкл розчиненої дволанцюгової "ДНК і заморожували при -20°C для подальшого аналізу за допомогою електрофорезу у гелі.

До 42мкл розчину дволанцюгової кДНК, що залишилися, додавали 5мкл 10 х буфера Кленова (Klenow) (buffer #3), 2,5мкл 2,5мм нуклеотидів (dCTP, dGTP, dATP і TTP), 0,5мкл 5 од./мкл фрагмента Кленова. Реакційну суміш витримували протягом 30 хвилин при 37 °C, додавали 50мкл води і екстрагували сумішню фенол.хлороформ (1:1), потім хлороформом, як описано вище. Після додавання 7мкл 3М ацетату натрію 226мкл 100%-ного етанолу виділяли дволанцюгову кДНК із "тупими кінцями" осадженням протягом 30 хвилин на льоду і наступним центрифугуванням на мікроцентрифузі при 4°C протягом 60 хвилин із максимальною швидкістю. Осад промивали 300мкл 80%-ного етанолу, центрифугували і висушили, як описано вище. Потім до висушеної кДНК додавали 7мкл 0,4 мг/мкл розчину EcoRI -лінкерів. Структура лінкерів є наступною:

5' AATTCGGCACGAG 3'

- 3' GCCGTGCTC 5'

Після перемішування до розчиненої кДНК додавали 1мкл 10 х буфера для лігування, 1мкл 10мм АТР і 1мкл 4 Weiss од./мкл Т4 ДНК-лігази і витримували протягом ночі при 8°C. Потім лігазу дезактивували нагріванням до 70°C протягом 30 хвилин. 5'-кінці EcoRI-лінкерів, приєднані до кДНК, піддавали фосфорилуванню з використанням полінуклеотидкінази. До реакційної суміші додавали 1мкл 10 х буфера #3, 2мкл 10мм АТР, 6мл води і 1мл 10 од./мл Т4 полінуклеотидкінази. Реакцію проводили протягом 30 хвилин, потім кіназу дезактивували нагріванням до 70°C протягом 30 хвилин.

"Липкі кінці" XhoI генерували на кінці кДНК, що відповідає 3'-кінцю мРНК, шляхом перетравлювання XhoI-сайта в лінкер-праймері (див. вище). 28мкл XhoI-буфера і 3мкл 40 од./мл XhoI додавали до кДНК і проводили реакцію при температурі 37°C протягом 1,5 годин. Потім кДНК із EcoRI "липкими кінцями" на 5'-кінці та з XhoI "липкими кінцями" на 3'-кінці (що відповідає вихідній мРНК) фракціонували за розміром на обертовій колонці Sephacryl S-400, як описано нижче. До кДНК додавали 5мкл 10 X STE (100мм Трис (pH 7,0), 5мм EDTA і 100мм NaCl) і наносили на верхню частину 1мкл шприца, що містить сефакрил (Sephacryl) S-400. Мікроцентрифужну пробірку на 500мкл поміщали в основі шприца, шприц поміщали в центрифужну пробірку і центрифугували протягом 2 хвилин зі швидкістю 400 об./хв. Потім додавали 60мкл 10 х STE у верхню частину шприца, нову мікроцентрифужну пробірку поміщали в основу шприца і знову центрифугували, як описано вище. Цю процедуру повторювали, поки не було зібрано 6 фракцій.

Приблизно 10% кожної фракції піддавали електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі для визначення розподілу за розмірами кДНК у кожній фракції. Залишок кожної фракції екстрагували рівними об'ємами фенол:хлороформ, потім хлороформом, як описано вище, й осаджували додаванням 2 об'ємів 100%-ного етанолу. Після витримування протягом ночі при -20 °C виділяли кДНК центрифугуванням зі швидкістю 14 000 об./хв. при 4°C протягом 60 хвилин у мікроцентрифузі. Промивали кДНК 200мкл 80%-ного етанолу, як описано вище, і висушували. Потім кДНК розчиняли в 5мкл води і відбирали 0,5мкл розчину для визначення концентрації кДНК методом флюорографії на ДНК флюориметрі Hoefer TKO 100. 4,5мл фракції 1, що залишилися, яка містить молекули кДНК найбільшого розміру, містила 304 нг кДНК.

100 нг кДНК із фракції 1 лігували у 1 мг Uni-Zap та вектор ZAP бактеріофага лямбда, що був розщеплений EcoRI і XhoI (Stratagene). Фракцію 1 кДНК (2,9 М1) додавали до 0,54мкл 10 X буфера для лігування, 0,5мкл 10мм АТР, 1мкл 1 мг/мкл вектора Uni-Zap XR і 0,5мкл 4 Weiss од./мкл Т4 ДНК лігази. Реакцію здійснювали протягом 44 годин при 8°C. Потім аліквоту 1мкл реакційної суміші додавали до однієї аліквоти екстракту "Freeze-Thaw" із набору реактивів для пакування GigaPack II Gold (Stratagene). Додавали 15мкл екстракту, обробленого ультразвуком, й обережно перемішували. Пакування проводили при кімнатній температурі. Через 2 години до реакційної суміші додавали 500мкл буфера SM (0,01 М Трис-HCl pH 7,5, 0,01 М MgCl₂, 0,1мм Na₂EDTA) і 20мкл хлороформу, залишки видаляли швидким центрифугуванням у мікроцентрифузі, спакзовані фаги зберігали при 4°C.

Ж. Визначення титру первинної бібліотеки.

1мкл із 500мкл первинної бібліотеки змішували з 9мкл буфера SM для розведення 1/10, 1мкл отриманого розчину використовували для інфікування 200мкл E. Coli XL1-Blue MRF⁺ клітин, вирощених до щільності, яка дорівнює O.D.₆₀₀=0,5. Клітини обробляли 15 хвилин при 37°C при обережному перемішуванні. Інфіковані клітини потім перемішували з 2,5мл агару при 48°C, що містить 15мкл 0,5 М IPTG і 250 мг/мл X-gal (5-бром-4-хлориндопіл-β-D-галактозид) і висівали на чашки розміром 100 X 15мм із середовищем NZY (5г/л NaCl, 2г/л MgSO₄ · 7H₂O, 5г/л дріжджового екстракту, 10г/л NZ аміну (pH 7,5), 15г/л агару Діфко). Чашки витримували протягом ночі при 37°C. Фонові пляшки були блакитними, рекомбінантні - білими. Усереднення по трьом чашках виявило, що первинна бібліотека давала 1930 рекомбінантних пляшок і 65 блакитних. Розрахували, що загальна кількість 500мкл первинної бібліотеки давала 965000 рекомбінантних пляшок.

К. Ампліфікація первинної бібліотеки.

У 20 стерильних пробірок поміщали 300мкл E. coli XL I-Blue MRF клітин, вирощених до щільності рівної O.D.₆₀₀=0,5. У кожну пробірку додавали по 12,5мкл вихідного розчину первинної бібліотеки і 90мкл SM буфера і витримували 15 хвилин при 37°C. 2,5мл агару при 48°C додавали в кожну пробірку і висівали на NZY чашки

розміром 100 X 15мм. Чашки витримували протягом ночі при 37°C. У кожену чашку додавали по 5мл SM буфера і витримували при 4°C протягом 8 годин. Потім стерильною піпеткою відбирали SM буфер і залишали в стерильній центрифужній пробірці на 250мл. Кожну чашку промивали 4мл свіжого SM буфера, який поєднували з раніше відібраним SM буфером. До ампліфікованої бібліотеки додавали хлороформ до заключної концентрації 5%. Потім бібліотеку витримували при кімнатній температурі 15 хвилин і центрифугували зі швидкістю 2000 об./хв. 10 хвилин для видалення залишків клітин. Видаляли супернатант (114,5мл) і переносили його у стерильну поліпропіленову пробірку. Додавали хлороформ до заключної концентрації 0,3% і зберігали ампліфіковану бібліотеку при 4°C.

L. Визначення титру ампліфікованої бібліотеки. 1мкл ампліфікованої бібліотеки у розведенні 10^{-11} у SM буфері містив 192 рекомбінантних бляшок, що виявлялося при висіванні, як описано вище. Для одержання 50000 рекомбінантних бляшок використовували 27мкл у розведенні 10^{-7} для інфікування 600мкл E. coli XL I-Blue MRF клітин, вирощених до щільності рівної $O.D_{600}=0,5$, які потім обробляли 15 хвилин при 37 °C. Далі до цих клітин додавали 6,5мл агару при 48°C і висівали на N2Y чашки розміром 100 x 15мм. Були підготовлені 4 такі чашки, що містять 200 000 рекомбінантних бляшок, які витримували протягом ночі при 37°C. Потім чашки охолоджували 4 години при 4°C і далі використовували для скринінга бібліотеки ДНК.

M. Ампліфікація кДНК ксантозин- N^7 -метилтрансферази за допомогою техніки ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції)

Синтез першого ланцюга кДНК описаний вище (метод Stratagene). Отримані шляхом триптичного розщеплення дві унікальні послідовності пептидів дозволили синтезувати вироджені праймери, приведені на Фігурі 4. Проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) (Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. та Erlich, H.A., Science 239: 487 (1988)) між парами праймерів (1-6, 2-6, 3-5 або 4-5) із використанням 4 нг кДНК, 1мкл 20 мкМ праймерів, 0,5мкл 1мМ кожного трифосфату дезоксирибонуклеотиду, 1,5мм МдCl₂, 0,3мкл Тад-полімерази ДНК (5000 од/мл), 2,5мкл 10 x ПЛР-буфера (10мм Трис-HCl (pH 9,0), 0,1% тритону X-100) і стерильної води до кінцевого об'єму 25мкл. Умови ПЛР - 94°C 4 хвилини (1 цикл); 94°C 1 хвилини, 43°C 1 хвилини; 72°C 1 хвилини (35 циклів); 72°C 5 хвилин (1 цикл). Реакції проводили у стерильних мікроцентрифужних пробірках на 500мкл, використовуючи термальний пристрій для управління циклами 480 (Perkin Elmer). Тільки комбінація праймерів 1 і 6 дала один продукт при температурі 43°C. Аналіз цього продукту за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (SeaPlaque agarose (FMC)) показав наявність приблизно 750 пар основ. Як маркер використовували комерційно доступний леддер розміром 100 пар основ (Promega Corporation).

M. Клонування продукту ПЛР гена, специфічного до ксантозин- IC^7 -метилтрансферази кави.

До 50мкл ПЛР-реакційної суміші, що містить фрагмент розміром 750 п.о, отриманий при використанні праймерів 1 і 6 (Фіг. 4), додавали 50мкл хлороформу і 100мкл стерильної води. Суміш перемішували й центрифугували в мікроцентрифузі протягом 2 хвилин зі швидкістю 14 000 об./хв. Відбирали верхній водний шар, що містить ДНК і поміщали у стерильну пробірку. Підрахування на пластині з бромистим етидієм показало присутність 5 нг ПЛР ампліфікованої ДНК в одному мкл. Потім ПЛР-продукт лігували в pCR II вектор із набору для клонування TA (Invitrogen Corporation). Реакційна суміш (10мкл) складалася з 1мкл 10 X буфера для лігування, 2мкл pCR II вектора (25 нг/мкл), 3мкл свіжого ПЛР-продукту (5нг/мкл), 1мкл T4 ДНК лігази і 3мкл стерильної води. Реакцію проводили при 14°C протягом ночі. Потім реакційну суміш центрифугували 2 хвилини зі швидкістю 14 000 об./хв. і ставили на лід. У свіжорозморожену пробірку з E coli XL1 -Blue компетентними клітинами додавали 0,5мкл 0,5 М А-меркаптоетанолу й обережно перемішували кінчиком піпетки. 2мкл суміші реакції лігування додавали за допомогою піпетки до клітин і обережно перемішували кінчиком піпетки. Пробірку витримували на льоду протягом 30 хвилин і точно на 30 секунд поміщали в термостат при 42 °C. Потім пробірку знову ставили на лід. Через 2 хвилини в неї додавали 450мкл стерильного середовища SOC (20г/л тритону, 5г/л дріжджового екстракту, 0,5г/л NaCl, 10мл/л 250мм KCl, 10мл/л MgCl₂, 20мл/л 1М глюкози, (pH 7,0)). Вміст пробірки перемішували на роторній качалці зі швидкістю 225 об./хв. протягом 1 години і потім поміщали на лід.

Суспензію трансформованих клітин наносили піпеткою по 50мкл і/або 200мкл на LB чашки (10г/л тритону, 5г/л дріжджового екстракту, 10г/л NaCl, 15г/л агару Difco, pH 7,5), що містять 50мкг/мл ампіциліну і 40мкг/мл X-gal. Чашки витримували при 37°C 20 годин, потім 3 години при 4°C для розвитку кольорових колоній. Шість білих колоній трансформантів аналізували на присутність і орієнтацію ПЛР-фрагмента.

N. Кип'ятіння міні-препарату плазмід.

Кожну з колоній трансформантів вирощували в 5мл стерильного бульйону (12г/л тритону, 24г/л дріжджового екстракту, 4мл/ гліцерину, 100мл/л 10 x ТВ фосфату [0,17 М KH₂PO₄, 0,72 М K₂HPO₄]) із 50мкг/мл ампіциліну. Пробірки витримували протягом ночі в роторній качалці при 37 °C. 3мл кожної колонії (по 1мл за 1 раз) переносили в центрифужні пробірки на 1,5мл, концентрували клітини центрифугуванням із швидкістю 14000 об./хв. 2 хвилини. Кожного разу супернатант декантували, а осад клітин максимально висушували. Потім клітини один раз промивали 1мл стерильної води і центрифугували так, як описано вище. Супернатант декантували, осад клітин суспендували в 320мкл буфера STET (8% сахарози, 0,5% тритону X-100, 50мм EDTA, 10мм Трис-HCl, pH 8,0). Далі до цих клітин додавали 32мкл 10 мг/мл розчину лізоциму у буфері TE (10мл/л 1 М Трис-HCl pH 8,0, 2мл/л 0,5 М EDTA pH 8,0) і перемішували, декілька разів перевертаючи пробірку. Пробірки поміщали на 5 хвилин у киплячу водяну баню, а потім швидко переносили на лід. Після охолодження вміст центрифугували 30 хвилин із швидкістю 14000 об./хв. Осад видаляли з кожної пробірки за допомогою стерильної

зубочистки. До супернатанту додавали 170мкл 7,5 М NH_4OAc і 550мкл крижаного ізопропанолу й осаджували ДНК при -20°C протягом ночі. Після цього пробірки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. при 4°C , осад промивали 75%-ним етанолом і висушували протягом 1 хвилини у вакуумі. ДНК розчиняли в 50мкл стерильної води, що містить 1мкл 5 мг/мл РНКази А.

О. Рестрикційне розщеплення для видалення інсерту з плазміді рCR II.

25мкл реакційної суміші готували шляхом додавання 15мкл міні-препарату плазмідної ДНК, отриманої, як описано вище, 2,5мкл буфера Н (90мм Трис- HCl (рН 7,5), 10мм MgCl_2 , 50мм NaCl), 1мкл EcoRI (8-12 од/мкл) і 6,5мкл стерильної H_2O . Суміш витримували при струшуванні на водяній бані при 37°C протягом 1 години, а потім кип'ятили на водяній бані 1 хвилину. Пробірки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. 15 секунд і охолоджували до кімнатної температури. До 10мкл кожної суміші додавали барвник і аналізували продукти розщеплення шляхом електрофорезу в 1,5%-ному гелі з особливо чистої агарози (GibcoBRL), використовуючи як маркер розміру ладдер 100 п.о. (Promega Corporation).

Тільки одна із шести реакцій показала присутність розщепленого інсерту ~ 750 п.о. Оригінальну колонію бактерій, що відповідає плазміді з ПЛР продуктом ксантозин N^7 -метилтрансферази 750 п.о., вносили в колбу Ерленмейєра на 250мл, що містить 50мл стерильного середовища LB (10г/л тритону, 5г/л дріжджового екстракту, 10г/л NaCl , рН 7,5) і 50 мг/мл ампіциліну). Колбу витримували на роторній качалці при 30°C протягом ночі. 18мл отриманої культури клітин концентрували центрифугуванням у мікроцентрифужній пробірці на 1,5мл, як описано вище.

Плазмідну ДНК очищали методом із використанням набору реактивів QIAGEN plasmid mini kit (Qiagen Inc.). Промитий осад бактерій суспендували в 0,3мл буфера Р1, що містить РНКазу. До отриманого розчину додавали 0,3мл лужного буфера для лізису Р2, обережно перемішували, струшуючи пробірку і витримували не більше 5 хвилин при кімнатній температурі. Потім додавали 0,3мл охолодженого буфера Р3 і перемішували, перевертаючи пробірку 6 разів. Після витримування на льоду протягом 10 хвилин екстракт центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. 15 хвилин на мікроцентрифузі. Супернатант видаляли і наносили на колонку QIAGEN-tip 20, попередньо врівноважену 1мл буфера QBT, пропущеного самотечею. Супернатант екстракту клітин також пропускали через колонку самотечею. Після того, як потік рідини через колонку припинився, її промивали 4 рази 1мл буфера QC. ДНК елюювали 0,8мл буфера QF і осаджували додаванням 0,7 об'ємів (560мкл) ізопропанолу при кімнатній температурі. Пробірку негайно центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. 30 хвилин і ретельно видаляли супернатант. Осаджену ДНК промивали 1мл крижаного 70%-ного ізопропанолу, центрифугували, як описано вище, і висушували на повітрі 5 хвилин. Далі ДНК суспендували у 100мкл стерильної води. Аналіз 1мкл розчину ДНК за допомогою УФ-спектрометрії, описаної вище, показав, що в 100мкл міститься 55мкг очищеної рекомбінантної рCRII плазмідної ДНК.

Автоматичне секвенування послідовності ДНК інсерту в плазміді рCRII від кінця 5' виконували з використанням зворотного праймера М13, який приєднували до згаданої рCRII поряд із сайтом, в який був вбудований ПЛР-продукт. Секвенування проводили в лабораторії біотехнології Гавайського Університету. Реакційна суміш містила 1мкг плазмідної матриці і 3,2 пмоль праймеру М13. Отримана послідовність показала, що ПЛР-продукт кодував ДНК послідовність перших 6 амінокислотних пептидних фрагментів А і В (Фіг. 4), із послідовностей яких були отримані вироджені ДНК праймери 1 і 2 (Фіг. 4). На додаток, отримана послідовність також кодувала наступні 7 амінокислот пептидного фрагмента ДНК, послідовність якого не використовувалася у побудові праймеру. Таким чином, фактично була клонована послідовність ДНК потрібного білка.

Р. Створення довільно праймованого зонда для скринінгу кДНК із використанням ПЛР-продукту.

Два рестрикційні розщеплення EcoRI по 25мкл здійснювали на 17,5мкл очищеної плазмідної рCRII, як описано вище. Продукти реакції розділяли на 1%-ному агарозному гелі, як описано вище, потім із двох смужок гелю вирізували інсerti 750 п.о. у стерильних умовах. Шматочки гелю масою 0,65 г переносили в стерильну поліпропіленову пробірку на 40мл і обробляли набором реактивів для очищення Geneclean II (BIO 101, Inc.). До зразків гелю додавали 4,5 об'єму вихідного розчину NaCl (2,93мл), 0,5 об'єму гель-модифікатора TBE (325мкл) і витримували 5 хвилин при 45°C . Потім у пробірку додавали 15мкл суспензії glassmilk і витримували ще 5 хвилин. Далі комплекс glassmilk/ДНК осаджували центрифугуванням протягом 10 секунд із швидкістю 1000 об./хв., супернатант видаляли. Осад промивали 3 рази 1мл розчином New Wash, а ДНК вимивали 50мкл стерильної води. Аналіз на планшетах із бромистим етидієм показав, що концентрація ДНК складає 10 нг/мкл.

Довільно праймований зонд синтезували з 30нг (3мкл) очищеної ДНК. 3мкл ДНК додавали до 27мкл стерильної води і денатурували нагріванням у киплячій водяній бані. До денатурованої ДНК додавали реактиви з набору Prime-a-Gene (Promega Corporations) (10мкл буфера з міткою, 2мкл немічених dNTP (по 20мкл dCTP, dGTP, TTP), 2мкл 1 мг/мл ацетильованого BSA (альбуміну бичачої сироватки), 1мкл 5 од/мкл ферменту Кленова) і 5мкл $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP (50 мкКи, 3000 Ки/ммоль; DuPont NEN) до заключного об'єму 50мкл і витримували при кімнатній температурі 1 годину. Завершували реакцію додаванням 0,5 М Na_2EDTA (заклучної концентрації 20мм) і нагріванням на киплячій водяній бані протягом 2 хвилин.

Q. Скринінг ампліфікованої бібліотеки довільно праймованим зондом.

Чотири чашки із середовищем NZY розміром 150х15мм, у кожній з яких знаходилося приблизно по 50000 рекомбінантних клонів (див. вище про умови висівання і вирощування), охолоджували до 4°C , потім рекомбінантні бляшки переносили першим промоканням за допомогою нейлонової мембрани 132 mm Magna (MSI Corporation) на хроматографічний папір, насичений 5 х SSC буфером протягом 10 секунд. Мембрани поміщали на чашки з рекомбінантними бляшками на 5 хвилин, потім забирали і наносили на 2 хвилини на хроматографічний папір, просочений розчином 0,5 М NaOH і 1,5 М NaCl , стороною, насиченою фагом, догори.

Після цього мембрани нейтралізували нанесенням на хроматографічний папір, просочений розчином 0,5 М Трис-НCl (рН 8,0) і 1,5 М NaCl, на 5 хвилин. Потім їх поміщали на 10 секунд на хроматографічний папір, просочений 2 x SSC буфером, 0,2 М Трис-НCl (рН 7,5) і промокали до осушення. Після висушування на повітрі протягом 1 години ДНК поперечно зшивали з мембранами шляхом обробки УФ-випромінюванням з енергією 12000 мкДж за допомогою УФ Stratalinker 1800 (Stratagene Corporation). Чотири мембрани попередньо гібридизували при 65°C 2 години у 10мл буфера 6 X SSPE (52,2г/л NaCl, 8,3г/л NaH₂PO₄ · H₂O, 2,2г/л Na₂EDTA, [рН 7,4]), 5 X розчину Денхарта (Denhardt) (1г/л фіколу, 1г/л полівінілпіролідону, 1г/л BSA (pentax фракція V)), 0,5% SDS і 100мкг/мл денатурованої ДНК сперми лосося в термостаті для гібридизації Hybrid Mark II.

Гібридизацію проводили при 65°C 12 годин у 10мл буфера 6 X SSPE, 0,5% SDS, 100мкг/мл денатурованої ДНК сперми лосося і 52мкл 15x10⁶ імп./хв./мл довільно праймованого зонду, описаного вище. Після закінчення гібридизації зонд видаляли, а мембрани швидко промивали (30 секунд) 100мл буфера, що містить 2x SSPE і 0,5% SDS, із температурою 65°C. Потім мембрани знову промивали 30 хвилин свіжою порцією (100мл) зазначеного розчину. Після цього мембрани промивали ще 2 рази по 30 хвилин 100мл розчину, що містить 0,2x SSPE і 0,5% SDS, із температурою 65°C, пакували в целофановий пакет і витримували протягом 24 годин на попередньо опроміненій рентгенівській плівці Fuji RXgcu при -70°C. Спостерігали 15 позитивних клонів. Ці бляшки відбирали й поміщали в 1мл буфера SM, що містить 20мкл хлороформу (вихідний розчин фага). 11 із них піддавали скринінгу у другий або третій раз, поки не були отримані індивідуальні бляшки.

R. Характеристика клонів ксантозин-N⁷-метилтрансферази кДНК.

Розміри передбачуваних клонів кДНК ксантозин-N⁷-метилтрансферази визначали за допомогою ПЛР із використанням праймерів, гомологічних Т3 і Т4 промоторам, що містяться у клонувальному векторі, і прилягають до сайту вбудовування кДНК. Умови ПЛР були аналогічними описаним вище, за винятком того, що цикл складався із 35 циклів по 1 хвилині при 95°C, 1 хвилині при 50°C і 2 хвилин при 72°C. Аналіз в агарозному гелі проводили, як описані вище. Три найбільші отримані колонії виділенню *in vivo*, змішуючи у стерильній пробірці 200мкл вихідного розчину фага з індивідуальною бляшкою з додаванням 200мкл свіжої культури клітин XL1-Blue MRF, вирощених до щільності O.D.₆₀₀=1,0. До цієї суміші додавали 1мкл фага-хелпера ExAssist (Stratagene Corporation) (>1x10⁶ бляшок/мкл) і витримували при 37°C 15 хвилин. Потім додавали 3мл середовища LB і витримували при 37°C 3 години при перемішуванні. Далі культуру нагрівали на водяній бані протягом 20 хвилин при 70°C і центрифугували зі швидкістю 1000 об./хв. протягом 15 хвилин. 1мл супернатанту, що містить вирізану рBluescript фagemіду, спаковували як ниткоподібна частинку фага, переносили у стерильну мікроцентрифужну пробірку на 1,5мл і зберігали при 4°C як вихідний розчин. 25мкл цього вихідного розчину поміщали в мікроцентрифужну пробірку з 200мкл клітин E. coli Solar, вирощених до щільності O.D.₆₀₀=1,0. Після витримання протягом 15 хвилин 200мкл клітин висівали в чашки розміром 100 x 15мм із середовищем NZY, що містить 50мкг/мл ампіциліну. Чашки витримували при 37°C протягом ночі до появи колоній. Одну колонію переносили в 10мл стерильного середовища LB, що містить 50мкг/мл ампіциліну, і вирощували при 37°C протягом ночі при струшуванні. 10мл культури клітин концентрували у стерильній мікроцентрифужній пробірці на 1,5мл, осад клітин очищали з використанням набору реактивів QIAGEN plasmid, як описано вище. Очищену плазмідну ДНК суспендували в 50мкл стерильної води. Проводили реакції автоматичного секвенування ДНК, змішуючи 8мкл цього зразка ДНК (8мкг) із 4мкл або Т3, або Т7 секвенуючих праймерів (0,8 пмоль/мкл). Умови реакцій описані вище. Кожна реакція секвенування давала приблизно 350 основ послідовності.

Послідовність представлена на Фігурі 5. Амінокислотна послідовність ксантозин-N⁷-метилтрансферази, передбачена з основної послідовності кДНК, представлена на Фігурі 6.

Описані приклади служать тільки для ілюстрації, і їх не варто розглядати як такі, що обмежують об'єм охорони винаходу, визначений у формулі винаходу, приведений далі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

(1) ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

- 5 (i) Заявник: Стайліс, Джон І.
Моїсладі, Істефо
Неупане, Кабі Р.
- 10 (ii) Назва винаходу: Очищені білки, послідовності рекомбінантної ДНК і способи
одержання напоїв, що не містять кофеїн
- (iii) Кількість послідовностей: 11
- (iv) Адреса:
- 15 (A) Адресат: Джонс, Дей, Рівіс і Пог
(B) Вулиця: Норт Пойнт, 901 Лейксайд Авеню
(C) Місто: Клівленд
20 (D) Штат: Огайо
(E) Країна: США
(F) Індекс: 44114
- (v) Комп'ютерна форма:
- 25 (A) Тип: 3,5 дюймова дискета, 1.44 МБ
(B) Комп'ютер: IBM PC сумісний
(C) Оперативна система: MS-DOS, 5.1
30 (D) Програмне забезпечення: WordPerfect для Windows, 6.1
- (vi) Дані за заявкою:
- (A) Номер заявки: 08/622, 679
(B) Дата подачі: 26.03.1996
35 (C) Клас: 800
- (vii) Повірений:
- (A) Ім'я: Гріфіт, Кальвін П.
40 (B) Пер. №: 34 831
(C) Телефон: 265036600003

U A 7 3 4 6 5 C 2

U A 7 3 4 6 5 C 2

U A 7 3 4 6 5 C 2

U A 7 3 4 6 5 C 2

- (ix) Контактні телефони:
 - (A) Телефон: (216) 5867050
 - (B) Факс: (216) 5790212

(1) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO: 1:

- (i) Характеристики послідовності:
 - (A) Довжина: 15 амінокислотних залишків
 - (B) Тип: амінокислотна
 - (C) Кінці ланцюжка: N/A
 - (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули:
 - (A) Опис: Пептид
- (v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент
- (ix) Особливості:
 - (A) Назва/позначення: Фрагмент А
 - (B) Інша інформація: Хаа означає - не визначено

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO: 1:

Ile	Asn	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Leu	Asp	Gln	Хаа	Gly
1				5					10					15

(1) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:2:

- (i) Характеристики послідовності:
 - (A) Довжина: 14 амінокислотних залишків
 - (B) Тип: амінокислотна
 - (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули:
 - (A) Опис: Пептид
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:2:

Ile	Asn	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Leu	Asp	Gln	Thr
1				5					10				

U A 7 3 4 6 5 C 2

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:3:

- 5 (i) Характеристики послідовності:
 - (A) Довжина: 20 пар основ
 - (B) Тип: нуклеїнова кислота
 - 10 (C) Ланцюжок: одиночний
 - (D) Топологія: лінійна
- 15 (ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота
 - (A) Опис: Праймер
- (v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент
- 20 (ix) Особливості:
 - (D) Інша інформація: N - інозин
- 25 (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:3:
ATNAAAYTAYG CNAGYGGNGC 20

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:4:

- 30 (i) Характеристики послідовності:
 - (A) Довжина: 20 пар основ
 - (B) Тип: нуклеїнова кислота
 - 35 (C) Ланцюжок: одиночний
 - (D) Топологія: лінійна
- 40 (ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота
 - (A) Опис: Праймер
- (v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент
- 45 (ix) Особливості:
 - (D) Інша інформація: N - інозин
- 50 (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:4:
ATNAAAYTAYG CNAGYGGNGC 20

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:5:

- 55 (i) Характеристики послідовності:

U A 7 3 4 6 5 C 2

- 5 (A) Довжина: 20 пар основ
(B) Тип: нуклеїнова кислота
(C) Ланцюжок: одиночний
(D) Топологія: лінійна
- 10 (ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота
(A) Опис: Праймер
(v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент
(ix) Особливості:
- 15 (D) Інша інформація: N - інозин
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:5:
CGNCCAGNCG NYTAYTTNAT 20
- 20 (2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:6:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 20 пар основ
(B) Тип: нуклеїнова кислота
(C) Ланцюжок: одиночний
(D) Топологія: лінійна
- 30 (ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота
(A) Опис: Праймер
(v) Тип фрагмента: внутрішній фрагмент
- 35 (ix) Особливості:
(D) Інша інформація: N - інозин
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:6:
CGNCCYCTYG CYTAYTTNAT 20
- 40 (2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:7:
(i) Характеристики послідовності:
(A) Довжина: 14 амінокислотних залишків
(B) Тип: амінокислотна
- 50
- 55
- 60
- 65

- 5 (C) Ланцюжок: одиничний
- (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули:
- (A) Опис: Пептид
- 10 (v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент
- (ix) Особливості:
- (D) Інша інформація: Xaa означає або Thr, або Asp
- 15 (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:7:
- Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe Xaa Phe Ile Asp Asp Gln Asp
- 20 1 5 10

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:8:

- (i) Характеристики послідовності:
- 25 (A) Довжина: 20 пар основ
- (B) Тип: нуклеїнова кислота
- (C) Ланцюжок: одиничний
- 30 (D) Топологія: лінійна
- (ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота
- 35 (A) Опис: Праймер
- (v) Тип фрагмента: внутрішній фрагмент
- (ix) Особливості:
- 40 (D) Інша інформація: N - інозин
- (xi) Опис послідовності SEQ ID NO:8:
- CAWTATGTNC CNTGTTATTT 20
- 45

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO:9:

- (i) Характеристики послідовності:
- 50 (A) Довжина: 20 пар основ
- (B) Тип: нуклеїнова кислота
- (C) Ланцюжок: одиничний
- 55

60

65

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: інша нуклеїнова кислота

5 (A) Опис: Праймер

(v) Тип фрагмента: Внутрішній фрагмент

(ix) Особливості:

10 (D) Інша інформація: N - інозин

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO:9:

AAWTAWCAHG GNACWTATTG 20

15 (2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO. 10:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 371 амінокислотний залишок

20 (B) Тип: амінокислотна

(C) Ланцюжок: одиничний

(D) Топологія: лінійна

25 (ii) Тип молекули:

(A) Опис: Білок

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO: 10:

30 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile Ile Asn
1 5 10 15
Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala Leu Gly Glu Gln
20 25 30
Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly Asp Ser Gln Asp Asp Asn
35 40 45
Gly Asn Asn Asn His Leu Asn Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro
50 55 60
Pro Tyr Gly Ile Asp Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr
65 70 75
Asn Gly Arg Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe
80 85 90
Asp Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp Ile
95 100 105
Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp
110 115 120
45 Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe Ser Phe Asn Glu Gln
125 130 135

50

55

60

65

5 Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile
 140 145 150
 Gly Asn Arg Ser Ala Thr Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr
 155 160 165
 Thr Val Ala Leu Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu
 170 175 180
 10 Pro Glu Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 185 190 195
 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg Thr Leu
 200 205 210
 15 Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe Gly Leu Gly Trp
 215 220 225
 Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser Thr Asp Gly Asn Cys Val
 230 235 240
 20 Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys
 245 250 255
 Pro Leu Val Asp Glu Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe
 260 265 270
 25 Leu Tyr Val Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr
 275 280 285
 Pro Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val Ser
 290 295 300
 30 Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln Ile Pro Cys
 305 310 315
 Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp Asp Phe His Pro Ser
 320 325 330
 35 Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu
 335 340 345
 Ser Ser Leu Leu Asp Ala Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr
 350 355 360
 40 Gly Lys Asn Cys His Asp Lys Val Lys Ile Gln
 365 370

(2) ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO: 11:

(i) Характеристики послідовності:

- 45 (A) Довжина: 1347 пар основ
 (B) Тип: нуклеїнова кислота
 50 (C) Ланцюжок: одиничний

55

60

65

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: кДНК, комплементарна мРНК

(ix) Особливості:

(A) Назва/позначення: CDS

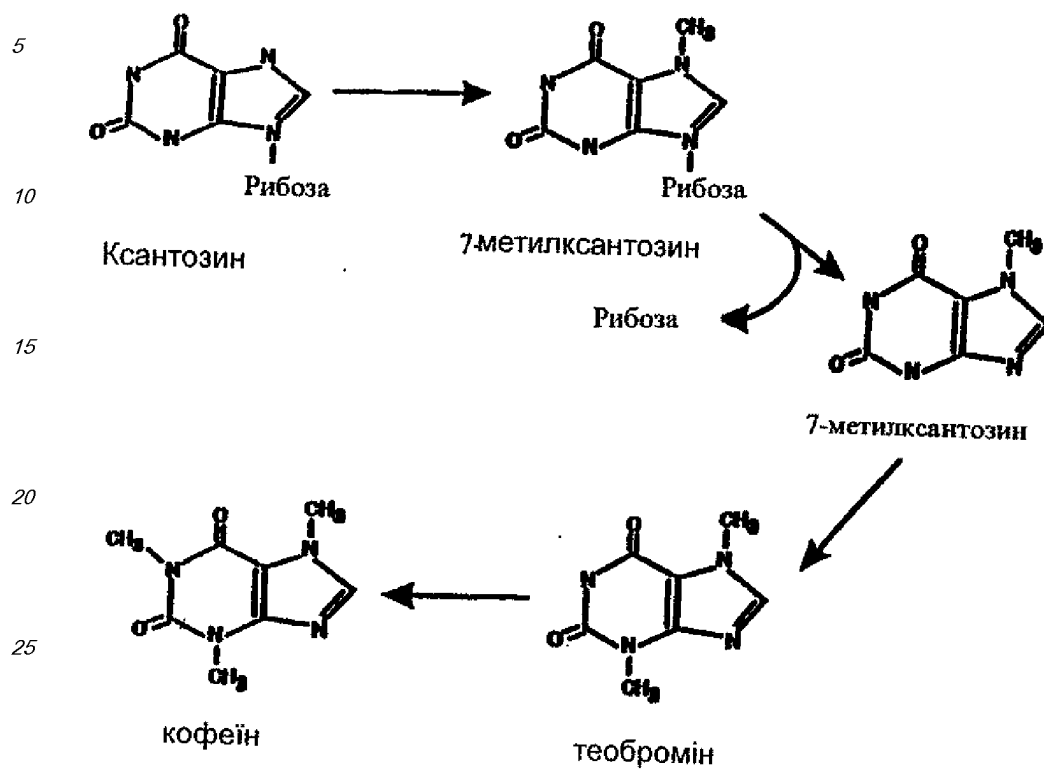
(B) Положення: 53... 1168

(xi) Опис послідовності SEQ ID NO: 11:

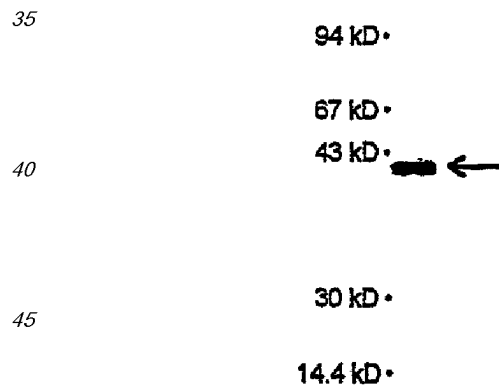
```
CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT TC 52
ATG GCT TTT GTA GCC AGG CAA TGG TTT CTC CTA TCC ATC ATT 94
Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile Ile
1 5 10
AAT GTA GTG GTT GTC TGT TTC TTG AAA CCA TTT GCC CTA GGC 136
Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala Leu Gly
15 20 25
GAA CAA CAG GTC CCT TGC TAC TTC ATT TTT GGA GAC TCA CAA 176
Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly Asp Ser Gln
30 35 40
GAT GAC AAT GGC AAC AAT AAT CAC CTG AAC ACC ACT GCC AGG 220
Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn Thr Thr Ala Arg
45 50 55
GCA AAT TAT CCA CCT TAC GGC ATT GAT TTC CCA GAA GGT CCA 262
Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp Phe Pro Glu Gly Pro
60 65 70
ACT GGT CGC TTC ACC AAT GGT CGA AAT CAT GCA GAC TTC ATT 304
Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg Asn His Ala Asp Phe Ile
75 80
GGT GAG CTC CTT GGA TTT GAC AGC TAC ATA CCT CCA TTT GCA 346
Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala
85 90 95
AAT ACA AAA GGC CGG GAT ATC ACT AAA GGC ATT AAT TAT GCT 388
Asn Thr Lys Gly Arg Asp Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala
100 105 110
TCG GGA GCA TCT GGA ATT CTT GAT CAG ACC GGT CGT CAC CTG 430
Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu
115 120 125
GGC GAT CTC TTC AGC TTC AAC GAA CAA TTG CAC AAT CAC GAG 472
Gly Asp Leu Phe Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu
130 135 140
```

	AGA	GCA	ATT	TCG	CGC	ATC	GTG	CGG	TTG	ATT	GGA	AAC	AGA	TCT	514
	Arg	Ala	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	
					145					150					
5	GCA	ACA	AAA	GAA	TAT	CTA	GCC	AAA	TGT	CTG	TAC	ACT	GTT	GCA	556
	Ala	Thr	Lys	Glu	Tyr	Leu	Ala	Lys	Cys	Leu	Tyr	Thr	Val	Ala	
	155					160					165				
	TTG	GGG	AAT	AAT	GAT	TAC	ATC	AAC	AAC	TAC	TTG	TTG	CCA	GAA	598
10	Leu	Gly	Asn	Asn	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Leu	Pro	Glu	
	170					175					180				
	TAT	TAT	CCT	ACC	AGC	CAC	CTA	TAT	ACT	CCA	AGA	GAA	TTT	GCC	640
	Tyr	Tyr	Pro	Thr	Ser	His	Leu	Tyr	Thr	Pro	Arg	Glu	Phe	Ala	
			185					190					195		
15	AGC	TTG	TTA	ATT	AGG	CAT	TAT	TCT	CAG	CAA	CTA	CGG	ACT	TTG	682
	Ser	Leu	Leu	Ile	Arg	His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Arg	Thr	Leu	
				200				205						210	
	TAC	AGA	TTG	GGG	GCA	AGA	AAA	ATA	GCC	GTT	TTT	GGG	CTT	GGT	724
20	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Lys	Ile	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	
					215					220					
	TGG	CTT	GGC	TGC	ATA	CCT	GCT	GAG	TTA	TCT	ACA	GAT	GGT	AAC	766
25	Trp	Leu	Gly	Cys	Ile	Pro	Ala	Glu	Leu	Ser	Thr	Asp	Gly	Asn	
	225					230					235				
	TGT	GTG	GAT	TCT	ATT	AAC	GAG	GAA	GTT	CTG	TTA	TTC	AAT	GAC	808
	Cys	Val	Asp	Ser	Ile	Asn	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	
		240				245						250			
	AAG	CTC	AAG	CCA	CTG	GTT	GAT	GAA	CTG	AAT	ACC	GAG	TTA	AGC	850
30	Lys	Leu	Lys	Pro	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	
			255					260					265		
	GGT	GCA	CAA	TTT	CTT	TAT	GTA	GAT	GTG	ATA	GCA	ATC	AAT	TTG	892
35	Gly	Ala	Gln	Phe	Leu	Tyr	Val	Asp	Val	Ile	Ala	Ile	Asn	Leu	
				270				275						280	
	AAC	AAT	TTA	TCC	ACC	CCT	GCA	GAA	ATT	ACA	ATT	GGC	AAT	GCA	934
	Asn	Asn	Leu	Ser	Thr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Ala	
					285					290					
	CCA	TGC	TGC	AAC	GTG	TCT	GCA	GCA	GTT	GCT	GGT	GGA	CAG	TGT	976
40	Pro	Cys	Cys	Asn	Val	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Gln	Cys	
	295					300					305				
	ATT	CCT	GGG	CAA	ATT	CCC	TGC	AGC	AAC	AGG	AAC	CAA	TAT	TAT	1018
45	Ile	Pro	Gly	Gln	Ile	Pro	Cys	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln	Tyr	Tyr	
		310				315						320			
	TTT	TGG	GAT	GAT	TTC	CAT	CCC	AGT	GAA	GTA	GTC	AAT	GAA	GCA	1060
	Phe	Trp	Asp	Asp	Phe	His	Pro	Ser	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Ala	
			325				330					335			
	TAT	TCA	AGA	TTA	GCA	TAT	TCT	GCG	TTA	TCC	TCA	TTA	CTT	GAT	1102
50	Tyr	Ser	Arg	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Asp	
				340				345					350		
	GCT	GAT	CCT	CTT	GCC	ATT	GGC	GGC	CTA	ACA	GGC	AAA	AAC	TGT	1144
55	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Ile	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Lys	Asn	Cys	
					355				360						
	CAT	GAT	AAA	GTG	AAG	ATA	CAA	TAGACTGTAT	CTATGTGTCC						1185
	His	Asp	Lys	Val	Lys	Ile	Gln								
		365				370									
	CATGATATTT	CTATATTCCA	AGTTTCCGAC	AAGTCAAAC	CAATGTATA										1235
60	AAACTTGAGA	GTCCGAATGT	GCTAGTGTGA	TGTTATCTCC	TCAATGGAAA										1285
	CAATATGTTA	TCATTAATCT	CAGACTATTT	ATAATTACTA	TTAAAAAAA										1335
	AAAAA	AAAAA	AA												1347
65															

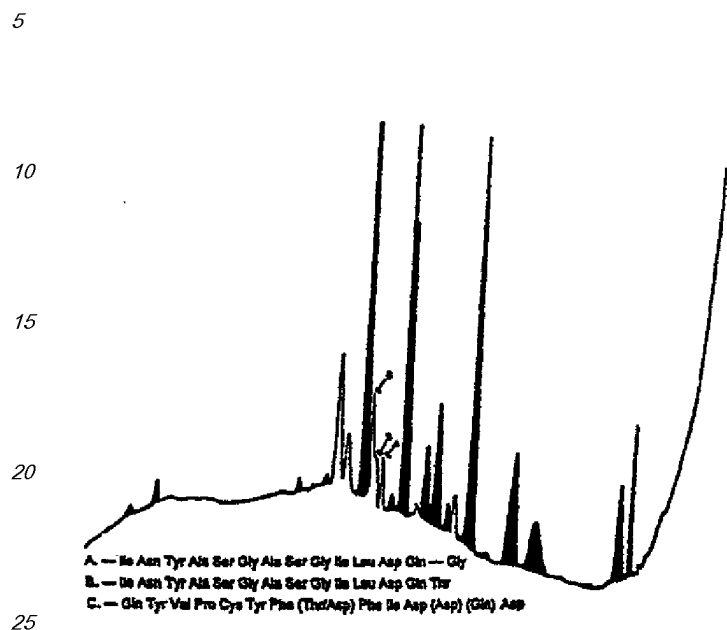
Креслення 1. процес біосинтезу кофеїну



Креслення 2. Поліакриламідний гель очищеної ксантиозин - N7 - метилтрансферази



Креслення 3. Розділення на ВЕРХ триптичних фрагментів
очищеної ксантозин - N7 - метилтрансферази



Креслення 4. Олігонуклеотиди, синтезовані з пептидів

Фрагмент А — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln — Gly
Фрагмент В — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr
Праймер 1 5'ATP AAG TAC GCI TCI GGI GC
Праймер 2 5'ATP AAG TAC GCI AGC GGI GC
Праймер 3 3TAT TTG AT GCGI AGI CCI GC
Праймер 4 3TAT TTG AT GCGI TC_A CCI GC
Фрагмент С — Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe^{Thr}_{Asp} Phe Ile Asp (Asp) (Gln) Asp
Праймер 5 5CA_A TAT GTI CCI TGT TAT TT
Праймер 6 3GTT AT_A GCAI GGI AC_A AT_A AA

Креслення 5

1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
 5 51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
 101 GTGGTTGTCT GTTCTTGAA ACCATTTGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
 151 TTGCTACTTC ATTTTTCAG ACTCACAAGA TGACAATGGC AACAAATATC
 10 201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAAATTATC CAGCTTACGG CATTGATTTC
 251 CCAGAAGGTC CAACTGGTCG CTTACCCAAT GGTCCAAATC ATGCAGACTT
 301 CATTGGTGAG CTCCTTGGAT TTGACAGCTA CATACCTCCA TTTGCAATA
 351 CAAAAGGCCG GGAATACCT AAAGGCCATTA ATTATGCTTC GCGAGCATCT
 15 401 GGAATTCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GCGGATCTCT TCAGCTTCAA
 451 CGAACAAATG CACAATCAG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGGTGA
 501 TTGCAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACCT
 551 GTTGCATTGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
 20 601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTGCG AGCTTGTAA
 651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GCGGCGAAGA
 701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GCCTGCATAC CTGCTGACTT
 751 ATCTACAGAT GGTAACTGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTAT
 25 801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
 851 GGTGCACAAT TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
 901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCACGTTG
 951 CTGCAGCACT TGCTGGTGA CAGTGTATTC CTGGGCAAT TCCCTGCAGC
 30 1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
 1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TCCGTTATCC TCATTACTTG
 1101 ATGCTGATCC TCTTGGCATT GCGGCGCTAA CAGGCAAAAA CTGTCTATG
 1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA
 35 1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AAATCAATG TAATAAAACT TGACAGTCCG
 1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAACAATA TGTATCATTT
 1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

U A 7 3 4 6 5 C 2

U A 7 3 4 6 5 C 2

Креслення 6.

1 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile
 14 Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala
 27 Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly
 40 Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn
 53 Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp
 66 Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg
 79 Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp
 92 Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp
 105 Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly
 118 Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 131 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile
 144 Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr
 157 Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu
 170 Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 183 Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 209 Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222 Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 235 Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val
 248 Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val Asp Glu
 261 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val
 274 Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
 287 Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asu Val
 300 Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
 313 Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
 326 Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
 339 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala
 352 Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
 365 His Asp Lys Val Lys Ile Gln

Формула винаходу

1. По суті чиста ксантозин-N⁷-метилтрансфераза з рослини кави, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 10:

1 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile
 14 Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala
 27 Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly
 40 Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn
 53 Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp
 66 Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg
 79 Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp
 92 Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp
 105 Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly
 118 Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 131 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile

144 Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr
 157 Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu
 170 Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 183 Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 209 Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222 Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 235 Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val
 248 Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val Asp Glu
 261 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val
 274 Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
 287 Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val
 300 Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
 313 Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
 326 Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
 339 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala
 352 Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
 365 His Asp Lys Val Lys Ile Gln.

2. По суті чиста ксантозин-N⁷-метилтрансфераза згідно з п. 1, де рослиною кави є *Coffea arabica*.

3. Очищена послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, що включає SEQ ID NO:11:

1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
 51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
 101 GTGGTTGTCT GTTTCCTGAA ACCATTGGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
 151 TTGCTACTTC ATTTTGGAG ACTCACAAGA TGACAATGGC AACAAATATC
 201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAATTATC CACCTTACGG CATTGATTTC
 251 CCAGAAGGTC CAACTGGTCG CTTACCAAT GGTGAAATC ATGCAGACTT
 301 CATTGGTGAG CTCCTTGGAT TTGACAGCTA CATACTCCA TTTGCAAATA
 351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
 401 GGAATCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GGCGATCTCT TCAGCTTCAA
 451 CGAACAATTG CACAATCACG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGGTGA

501 TTGGAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
551 GTTGCAATTGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTTGCC AGCTTGTTAA
651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGGCAAGA
701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
751 ATCTACAGAT GGTAACGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
851 GGTGCACAAT TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATT
901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCAACGTGT
951 CTGCAGCAGT TGCTGGTGGA CAGTGTATTC CTGGGCAAAT TCCTGCAGC
1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TGGTTATCC TCATTACTTG
1101 ATGCTGATCC TCTTGCCATT GGCAGCCTAA CAGGCAAAA CTGTCATGAT
1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA
1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AACTCAATG TAATAAACT TGAGAGTCCG
1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAACAATA TGTATCATT
1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAA AAAAAAAAA AAAAAA

b) послідовність ДНК, яку гібридизують із вищезгаданою послідовністю ДНК, причому зазначена гібридна послідовність суттєво складається з послідовності, комплементарної вищезгаданій послідовності ДНК; і

c) послідовність ДНК, яка є виродженою стосовно вищезгаданої послідовності ДНК.

4. Спосіб одержання кавових зерен, що не містять кофеїну, який включає:

a) трансформацію рослин кави послідовністю ДНК, яка є антисмисловою до послідовності ДНК SEQ ID NO: 11;

1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCIT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGA
101 GTGGTTGTCT GTTTCTTGAA ACCATTGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
151 TTGCTACTTC ATTTTGGAG ACTCACAGA TGACAATGGC AACATAATC
201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAATTATC CACCTTACGG CATTGATTTC
251 CCAGAAGGTC CAACTGGTGG CTTACCAAT GGTGAAATC ATGCAGACTT
301 CATTGGTGAG CTCCTTGGAT TTGACAGCTA CATACCTCCA TTTGCMAATA
351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
401 GGAATCTTGG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GCGATCTCT TCAGCTTCAA
451 CGAACAAATG CACAATCACG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGGTTGA

501 TTGGAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
 551 GTTGCAATGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
 601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTGGCC AGCTTGTAA
 651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGGCAAGA
 701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
 751 ATCTACAGAT GGTAACGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
 801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
 851 GGTGCACAA TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
 901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCACGTGT
 951 CTGCAGCAGT TGCTGGTGGG CAGTGTATTC CTGGGCAAAAT TCCCTGCAGC
 1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
 1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TGGTTATCC TCATTACTTG
 1101 ATGCTGATCC TCTTGCCATT GCGGGCCTAA CAGGCAGAAA CTGTCATGAT
 1151 AAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA
 1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AACTCAATG TAATAAACT TGAGAGTCCG
 1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAACAATA TGTATCAAT
 1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

б) одержання плодів від трансформованих рослин кави.

5. Метод одержання кавових зерен, що не містять кофеїну, який включає трансформацію рослин кави послідовністю ДНК, що є антисмисловою до послідовності ДНК, яка кодує експресію SEQ ID NO:10:

1 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile
 14 Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala
 27 Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly
 40 Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn
 53 Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp
 66 Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg
 79 Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp
 92 Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp
 105 Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly
 118 Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 131 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile

144 Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr
 157 Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu
 170 Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 183 Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 209 Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222 Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 235 Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val
 248 Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val Asp Glu
 261 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val
 274 Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
 287 Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val
 300 Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
 313 Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
 326 Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
 339 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala
 352 Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
 365 His Asp Lys Val Lys Ile Gln.

6. По суті чиста ксантозин-N⁷-метилтрансфераза, ізольована з рослини кави, яка включає триптичні фрагменти, що мають амінокислотні послідовності (i) (SEQ ID N0:1) або (ii) (SEQ ID N0:2).

7. По суті чиста ксантозин-N⁷-метилтрансфераза згідно з п. 6, де рослиною кави є *Coffea arabica*.

8. Ізольована з рослини кави послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID N0:10.

9. Послідовність нуклеїнової кислоти згідно з п. 8, де рослиною кави є *Coffea arabica*.

10. Рослина кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID N0:10, причому РНК має довжину принаймні 50 основ.

11. Рослина кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID N0:10.

12. Рослина кави згідно з п. 11, де послідовність нуклеїнової кислоти зв'язана з промотором транскрипції в антисмисловій орієнтації.

13. Трансформована рослина кави, отримана шляхом введення в геном рослини послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID N0:10.

14. Кавові зерна від рослин кави згідно з будь-яким з пунктів 10-13.

15. Вектор трансформації, який включає промотор транскрипції, зв'язаний із (i) послідовністю нуклеїнової кислоти (SEQ ID N0:11); або з (ii) послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує експресію амінокислотної послідовності: (SEQ ID N0:10).

16. Вектор трансформації згідно з п. 15, в якому послідовність нуклеїнової кислоти оперативно зв'язана з промотором транскрипції в антисмисловій орієнтації.

17. Вектор трансформації згідно з п. 15, в якому промотором є 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти.

18. Вектор трансформації згідно з п. 15, в якому вектором є модифікована плазмідна рВІ-121.

19. Клітина рослини кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID N0:10, причому РНК має довжину принаймні 50 основ.

20. Трансформована клітина рослини кави згідно з пунктом 19, де клітина демонструє знижену продукцію кофеїну в порівнянні з клітиною рослини кави, нетрансформованою послідовністю нуклеїнової кислоти.

21. Клітина рослини кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.

22. Клітина рослини кави згідно з п. 21, де послідовність нуклеїнової кислоти зв'язана з промотором транскрипції в антисмисловій орієнтації.

23. Трансформована клітина рослини кави згідно з будь-яким з пунктів 21-22, де клітина демонструє знижену продукцію кофеїну в порівнянні з клітиною рослини кави, нетрансформованою послідовністю нуклеїнової кислоти.

24. Трансформована клітина рослини кави, отримана шляхом введення вектора трансформації у клітину рослини кави, де вектор трансформації включає промотор транскрипції, оперативно зв'язаний із послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.

25. Трансформована клітина рослини кави згідно з п. 24, де послідовність нуклеїнової кислоти оперативно зв'язана з промотором транскрипції в антисмисловій орієнтації.

26. Трансформована клітина рослини кави згідно з будь-яким з пунктів 24-25, де клітина демонструє знижену продукцію кофеїну в порівнянні з клітиною рослини кави, нетрансформованою послідовністю нуклеїнової кислоти.

27. Рослина кави, регенерована з трансформованої клітин рослини кави згідно з будь-яким з пунктів від 24-26.

28. Кавові зерна, отримані з регенерованої рослини кави згідно з п. 27.

29. Спосіб інгібування продукції кофеїну клітинами рослини кави, який включає наступні етапи:

одержання вектора трансформації, який містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка має довжину принаймні 50 основ, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, причому послідовність нуклеїнової кислоти оперативно зв'язана з промотором транскрипції в антисмисловій орієнтації; і

введення вектора трансформації у клітину рослини кави, в результаті чого послідовність нуклеїнової кислоти вводиться в геном клітини рослини кави для одержання трансформованої клітини, причому трансформована клітина демонструє знижену продукцію кофеїну в порівнянні з клітинами рослини кави, нетрансформованими послідовністю нуклеїнової кислоти.

30. Рослина кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази та має послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:11, причому РНК має довжину принаймні 50 основ.

31. Рослина кави згідно з п. 30, де ксантозин-N⁷-метилтрансфераза включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.

32. Кавові зерна з рослини кави згідно з пунктом 30.

33. Клітина рослини кави, трансформована послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує транскрипцію РНК, яка є антисмисловою до мРНК, що кодує експресію ксантозин-N⁷-метилтрансферази та має послідовність SEQ ID NO:11, причому РНК має довжину принаймні 50 основ.

34. Клітина рослини кави згідно з п. 33, де ксантозин-N⁷-метилтрансфераза включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.