



(19) **UA** (11) **48 104** (13) **C2**

(51)МПК ⁷ **C 12N 15/32 A, C 12N 15/82 B,
C 12N 5/10 B, A 01N 63/02 B, C
07H 21/04 B, A 01H 5/00 B, A 01H
5/10 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ**

(21), (22) Заявка: 94005307, 05.10.1992

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2002

(30) Приоритет: 04.10.1991 US 772027
25.09.1992 US 951715

(46) Дата публикации: 15.08.2002

(86) Заявка PCT:
PCT/US92/08476, 19921005

(72) Изобретатель:

Козиел Майкл Г., US,
Дасай Налини М., US,
Льюис Келли С., US,
Крамер Ванс К., US,
Уоррен Грегори У., US,
Эвола Стивен В., US,
Кроссланд Лайл Д., US,
Райт Марта С., US,
Мерлин Эллис Дж., US,
Лонис Карен Л., US,
Ротстайн Стивен Дж., US

(73) Патентовладелец:
НОВАРТИС АГ, CH

(54) ФРАГМЕНТ ДНК, СОДЕРЖАЩИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, КОТОРАЯ КОДИРУЕТ ИНСЕКТИЦИДНЫЙ ПРОТЕИН, ОПТИМИЗИРОВАННУЮ ДЛЯ КУКУРУЗЫ, ФРАГМЕНТ ДНК, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ НАПРАВЛЕННУЮ ЖЕЛАТЕЛЬНУЮ ДЛЯ СЕРДЦЕВИНЫ СТЕБЛЯ ЭКСПРЕССИЮ СВЯЗАННОГО С НЕЙ СТРУКТУРНОГО ГЕНА В РАСТЕНИИ, ФРАГМЕНТ ДНК, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ДЛЯ ПЫЛЬЦЫ ЭКСПРЕССИЮ СВЯЗАННОГО С НЕЙ СТРУКТУРНОГО ГЕНА В РАСТЕНИИ, РЕКОМБИНАНТНАЯ МОЛЕКУЛА ДНК, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ДЛЯ КУКУРУЗЫ КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИНСЕКТИЦИДНОГО ПРОТЕИНА, СПОСОБ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОТ ОДНОГО НАСЕКОМОГО-ВРЕДИТЕЛЯ

(57) Реферат:

Рассмотрены последовательности ДНК, оптимизированные для экспрессии в растениях. Последовательности ДНК преимущественно кодируют инсектицидные полипептиды, в частности, инсектицидные белки из *Bacillus thuringiensis*. Описаны также растительные промоторы, в частности, специфически тканевые и преимущественно тканевые промоторы. Кроме того, рассмотрены трансформирующие векторы, содержащие указанные последовательности ДНК.

Трансформирующие векторы показывают высокие уровни инсектицидной активности при их введении в кукурузу.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(19) **UA** (11) **48 104** (13) **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 15/32 A, C 12N 15/82
B, C 12N 5/10 B, A 01N 63/02 B,
C 07H 21/04 B, A 01H 5/00 B, A
01H 5/10 B**

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

(21), (22) Application: 94005307, 05.10.1992

(24) Effective date for property rights: 15.08.2002

(30) Priority: 04.10.1991 US 772027
25.09.1992 US 951715

(46) Publication date: 15.08.2002

(86) PCT application:
PCT/US92/08476, 19921005

(72) Inventor:

KOZIEL Michael G., US,
DESAI Nallini M., US,
LEWIS Kelly S., US,
KRAMER Vance C., US,
WARREN Gregory W., US,
EVOLA Stephen V., US,
CROSSLAND Lyle D., US,
WRIGHT Martha S., US,
MERLIN Ellis J., US,
LAUNIS Karen L., US,
ROTHSTEIN Steven J., US

(73) Proprietor:

NOVARTIS AG, CH

(54) DNA FRAGMENT INCLUDING SEQUENCE THAT CODES AN INSECTICIDE PROTEIN WITH OPTIMIZATION FOR CORN, DNA FRAGMENT PROVIDING DIRECTED PREFERABLE FOR THE STEM CORE EXPRESSION OF THE STRUCTURAL GENE OF THE PLANT RELATED TO IT, DNA FRAGMENT PROVIDING SPECIFIC FOR THE POLLEN EXPRESSION OF RELATED TO IT STRUCTURAL GENE IN THE PLANT, RECOMBINANT DNA MOLECULE, METHOD FOR OBTAINING A CODING SEQUENCE OF THE INSECTICIDE PROTEIN OPTIMIZED FOR CORN, METHOD OF CORN PLANTS PROTECTION AT LEAST AGAINST ONE PEST INSECT

(57) Abstract:

DNA sequences optimized for expression in plants are disclosed. The DNA sequences preferably encode for an insecticidal polypeptides, particularly insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. Plant promoters, particular tissue-specific and tissue-preferred promoters are also provided. Additionally disclosed are transformation vectors comprising

said DNA sequences. The transformation vectors demonstrate high levels of insecticidal activity when transformed into maize.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 8, 15.08.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **48 104** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/32 A, C 12N 15/82 B,
C 12N 5/10 B, A 01N 63/02 B, C
07H 21/04 B, A 01H 5/00 B, A 01H
5/10 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
94005307, 05.10.1992

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 04.10.1991 US 772027
25.09.1992 US 951715

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.08.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
РСТ/US92/08476, 19921005

(72) Винахідник(и):

Козієл Майкл Г., US,
Дасай Наліні М., US,
Льюїс Келлі С., US,
Краммер Ванс К., US,
Уоррен Грегори У., US,
Евола Стівен В., US,
Кроссланд Лайл Д., US,
Райт Марта С., US,
Мерлін Елліс Дж., US,
Лоніс Карен Л., US,
Ротстайн Стівен Дж., US

(73) Власник(и):

НОВАРТИС АГ, СН

(54) ФРАГМЕНТ ДНК, ЯКИЙ МІСТИТЬ ПОСЛІДОВНІСТЬ,ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ ПРОТЕЇН, ОПТИМІЗОВАНУ ДЛЯ КУКУРУДЗИ, ФРАГМЕНТ ДНК, ЯКИЙ ЗАБЕЗПЕЧУЄ НАПРАВЛЕНУ БАЖАНУ ДЛЯ СЕРЦЕВИНИ СТЕБЛА ЕКСПРЕСІЮ ЗВ'ЯЗАНОГО З НЕЮ СТРУКТУРНОГО ГЕНА В РОСЛИНІ, ФРАГМЕНТ ДНК, ЯКИЙ ЗАБЕЗПЕЧУЄ СПЕЦИФІЧНУ ДЛЯ ПИЛКУ ЕКСПРЕСІЮ ЗВ'ЯЗАНОГО З НЕЮ СТРУКТУРНОГО ГЕНА В РОСЛИНІ, РЕКОМБІНАНТНА МОЛЕКУЛА ДНК, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ОПТИМІЗОВАНОЇ ДЛЯ КУКУРУДЗИ КОДУЮЧОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ІНСЕКТИЦИДНОГО ПРОТЕЇНУ, СПОСІБ ЗАХИСТУ РОСЛИН КУКУРУДЗИ ЩОНАЙМЕНШЕ ВІД ОДНІЄЇ КОМАХИ-ШКІДНИКА

(57) Реферат:

Розглянуто послідовності ДНК, оптимізовані для експресії в рослинах. Послідовності ДНК переважно кодують інсектицидні поліпептиди, зокрема, інсектицидні білки з *Bacillus thuringiensis*. Описано також рослинні промотори, зокрема,

специфічно-тканинні і переважно-тканинні промотори. Крім того, розглянуто вектори, що трансформують, які містять зазначені послідовності ДНК. Вектори, що трансформують, показують високі рівні інсектицидної активності при їхньому введенні в кукурудзу.

Опис винаходу

Фрагмент ДНК, содержащий кодирующую инсектицидную последовательность, оптимизированную для кукурузы, фрагмент ДНК, обеспечивающий направленную предпочтительную для сердцевинки стебля экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, фрагмент ДНК, обеспечивающий специфическую для пыльца экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, рекомбинантная молекула ДНК, способ получения оптимизированной для кукурузы кодирующей последовательности инсектицидного протеина, способ защиты растений кукурузы, по меньшей мере, от одного насекомого-вредителя.

Данная заявка является частичным продолжением заявки США, регистрационный номер 772,027, поданной 4 октября 1991 г., которая полностью раскрывается в нижеприведенном описании.

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

Экспрессия генов инсектицидного белка /IP/, выделенного из *Bacillus thuringiensis* (Bt) в растения оказалась чрезвычайно трудной задачей. Делались попытки экспрессировать в растения комбинации химерный промотор/ген Bt IP. Обычно в трансгенных растениях получали только низкий уровень белка. См., например, Vaecck et al., Nature 328:33-37, 1987; Barton et al., Plant Physiol. 85:1103-1109, 1987; Filschoff et al., Bio/Technology 5:807-813, 1987.

Одним из обоснованных объяснений причины низкой экспрессии является то, что случайные участки обработки транскрипции создают aberrантные формы транскрипта мРНК Bt IP. Эти aberrантно обработанные транскрипты в растении не являются функциональными, в смысле образования инсектицидного белка. Возможные участки обработки включают участки полиаденилирования, области сплайсинга интрона, сигналы прекращения транскрипции и транспортные сигналы. Большинство генов не содержат участков, которые вредно влияют на экспрессию гена в обычный организм-хозяин. Однако, случайная встречаемость таких участков обработки в области кодирования могла бы осложнить экспрессию указанного гена в трансгенные организмы-хозяева. Например, кодирующая область для гена инсектицидного кристаллического белка, выделенного из штамма *Bacillus thuringiensis* вида *kurstaki* /Генбанк BTHKURHD, каталожный Номер M15271, *B. thuringiensis* вида *kurstaki*, HD-1; Gelser et al. Gene 48:109-118 /1986//, выделенного непосредственно из *Bacillus thuringiensis*, могла бы содержать участки, которые препятствуют правильной обработке указанного гена в растениях.

Кроме того, трудности возникают при попытке экспрессировать белок *Bacillus thuringiensis* в организм, например в растение. Было обнаружено, что использование кодона гена нативного Bt ГР-значительно отличается от использования кодона типичного для гена растения. В частности, использование кодона гена нативного Bt IP резко отличается от использования кодона гена кукурузы. В результате, мРНК из этого гена не может эффективно использоваться. Использование кодона может влиять на экспрессию генов на уровне трансляции, или транскрипции или обработки мРНК. С целью оптимизации инсектицидного гена для его экспрессии в растения делались попытки изменить ген, чтобы придать ему по возможности большее сходство с генами-, которые естественным образом содержатся в растении-хозяине, подлежащем трансформации.

Adang и др. в патенте EPB № 0359472 /1990/ ссылаются на синтетический ген *Bacillus thuringiensis* *tenebrionis* /Btt/, который на 85 процентов гомологичен нативному гену Btt, и который конструируется так, чтобы иметь содержание А + Т приблизительно равное содержанию А + Т, обычно обнаруживаемому в растениях. В таблице 1 вышеуказанного патента показана последовательность кодона синтетического гена Btt, который был сконструирован для придания большего сходства с нормальным распределением кодона генов двудольных. Adang и др. утверждают, что синтетический ген, кодирующий IP, может быть оптимизирован с целью повышения экспрессии в однодольные растения аналогичными способами, ссылаясь на частоту использования кодона высокоэкспрессированных белков однодольных растений, как это видно из Таблицы 1. На странице 9 Adang и др. утверждают, что синтетический ген Btt сконструирован с тем, чтобы иметь содержание А + Т, равное 55% (и при этом содержание G + C, равно 45%). На странице 20 Adang и др., отмечают, что синтетический ген конструируется путём изменения отдельных аминокислотных кодонов в нативном геноме Bt для того, чтобы отразить общее распределение кодонов, предпочтительных для генов двудольных для каждой аминокислоты внутри кодирующей области гена. Adang и др., кроме того, утверждают, что только некоторые кодоны нативных генов Bt будут замещаться наиболее предпочтительным кодоном растения для каждой аминокислоты, так, что общее распределение кодонов, используемых в белках двудольных растений сохраняется.

Plachhoff и др. в патенте EPB № 0 385 962 /1990/ ссылаются на гены растений, кодирующих токсин кристаллического белка *Bacillus thuringiensis*. В таблице V Filschhoff et al, приводит процентное использование кодонов для каждой аминокислоты. На стр.8 Filschhoff et al высказывают предположение о модификации гена нативного Bt за счет удаления условных: сигналов полиаденилирования и последовательностей АТТТА. Filschhoff et al кроме того, предлагают осуществить сканирование последовательности гена нативного Bt для областей, имеющих больше, чем четыре последовательных нуклеотида аденина или тимина, с целью идентификации условных сигналов полиаденилирования растения. Filschhoff et al, утверждают, что нуклеотидная последовательность должна изменяться, если более чем один условный сигнал аденилирования идентифицируется среди десяти нуклеотидов. На стр.9 Filschhoff et al. утверждают, что необходимо приложить усилия для отбора кодонов с целью доведения содержания G + C до приблизительно 50%.

Barton et al. в Трудах Национальной академии наук США 88:3324-3328 /1991/ ссылаются на

модифицированные кодирующие последовательности гена *Bacillus thuringiensis cryIA(b)*, а также логические последовательности, на которые ссылаются PIsahhoff др.. Как видно из Таблицы 1 на странице 3325, частично модифицированный ген, описанный Perla и др., имеет приблизительно 96-процентную гомологию с нативным геном *cryIA(b)* /1681 из 1743 нуклеотидов/, при содержании G + C, равном 41%, количестве последовательностей сигналов полиаденилирования растений /PPSS/ уменьшенном с 18 до 7, и количестве последовательностей АТТТА, уменьшенном с 13 до 7. Полностью модифицированный ген *cryIA(b)*, описанный Perla и др., представляет собой полностью синтетический ген /страница 3325, КОЛОНКА 1/. Этот ген имеет приблизительно 79-процентную гомологию с нативным геном *cryIA(b)* /1455 из 1845 нуклеотидов/ при содержании G + C, равном 49%, количестве последовательностей сигналов полиаденилирования растений /PPSS/, уменьшенном до 1 и полном отсутствии последовательностей АТТТА.

Barton и др. в патенте EPB № 0 431 829 /1991/ описывают экспрессию инсектицидного токсина в растения. В колонке 10 описания вышеуказанного патента приведена конструкция синтетического гена AaIT токсина насекомого, кодирующего токсин скорпиона с использованием наиболее предпочтительного кодона для каждой аминокислоты в соответствии с графиком, показанным на фиг.1 указанного патента.

Настоящее изобретение относится к способам повышения экспрессии гетерологических генов в клетки растений. В общем случае ген или кодирующий участок, представляющий интерес, конструируется так, чтобы образовать специфическую последовательность преимущественного кодона растения. В этом случае использование кодона для определённого белка изменяется с целью повышения экспрессии в определённое растение. Такие кодирующие последовательности, оптимизированные относительно растения, могут быть опарам больно связаны с промоторами, способными направлять экспрессию кодирующей последовательности в клетку растения.

В частности, одной из целей настоящего изобретения является создание синтетических генов инсектицидного белка, которые оптимизированы для экспрессии в растения.

Другой целью настоящего изобретения является создание синтетических генов инсектицидного белка Bt с целью максимизации экспрессии белка Bt в растении, предпочтительно в кукурузу. Одной из особенностей настоящего изобретения является то что Синтетический ген Bt IP конструируется с использованием наиболее предпочтительных кодонов кукурузы, за исключением изменений, необходимых для образования участков легирования при конструировании полностью синтетического гена.

В соответствии с вышеуказанными целями были синтезированы гены инсектицидного кристаллического белка, в котором использование кодона изменено для повышения экспрессии в растения, в частности, в кукурузу. Однако, вместо того, чтобы изменять использование кодона с целью придания сходства гену кукурузы, исходя из полного распределения кодона, использование кодона было оптимизировано за счет использования наиболее предпочтительных для кукурузы кодонов /преимущественно кукурузные кодоны/ при синтезе синтетического гена. Оптимизированное использование преимущественно кукурузного кодона является эффективным средством для экспрессии инсектицидного белка Bt на высоких уровнях. Это может быть достигнуто за счет максимизации количества инсектицидного белка Bt, транслированного из данной популяции матричных РНК. Синтез гена Bt IP с использованием преимущественно кукурузных кодонов также направлен на исключение случайных участков обработки, которые могут выявляться в нативной кодирующей последовательности. Экспрессия такого синтетического гена в клетке кукурузы значительно выше, чем экспрессия нативного гена Bt IP.

Предпочтительные синтетические последовательности ДНК, оптимизированные относительно кукурузы, согласно настоящему изобретению выделяют из белка, кодированного геном *cryIA(a)* в *Bacillus thuringiensis* вида *kurstaki*, HD-1; Gelsner et al., *Gene*, 4P:IC9-II8 /1986/ или геном *cryIb/ACA Crya4* ген/- опизайим — Brizzardn Whiteley, *Nuc. Acids.Res.*, 16:2723 /1988/. Последовательность ДНК нативного гена HD-1 *cryIA(b)* *kurstaki* показана в виде Последовательности 1. Указанные белки являющаяся активными по отношению к различным чешуекрылым насекомым, включая *Ostrinia nubilalis*, Европейский зерновой точильщик.

В то время как настоящее изобретение поясняется примером синтеза генов белка Bt, оптимизированного относительно кукурузы, ясно, что заявляемый способ может быть использован для оптимизации экспрессии любого белка в растения.

Оптимизированные для определенной стадии гены могут быть слиты с различными промоторами, включая конститутивные, индуцированные, временно упорядоченные, эволюционно упорядоченные, преимущественно тканевые и специфически тканевые промоторы, предназначенные для получения молекул рекомбинантной ДНК, то есть химерных генов. Оптимизированный Относительно кукурузы ген /кодирующая последовательность/ обеспечивает значительно более высокие уровни экспрессии в трансформированное растение по сравнению с неоптимизированным относительно кукурузы геном. Соответственно этому может быть выработана сопротивляемость растений к жесткокрылым или чешуекрылым вредителям, например, к Европейскому зерновому точильщику и точильщику сахарного тростника.

Другой целью настоящего изобретения является создание преимущественно тканевых и специфически тканевых промоторов, которые направляют экспрессию операбельно ассоциированного структурного гена, представляющего интерес, в специфическую часть или части растения при почти полном исключении экспрессии в другие части.

Еще одной целью настоящего изобретения является созданий преимущественно сердцевинных промоторов. Под "сердцевинным промотором" понимается промотор, который способен направлять экспрессию операбельно ассоциированного структурного гена в большей, степени в сердцевину растения, чем в корни, внешнюю оболочку и опорные корни при почти полном отсутствии экспрессии в семя.

Ещё одной целью настоящего изобретения является создание специфически пыльцевых промоторов. Под "специфически пыльцевым" понимается промотор, способный направлять экспрессию операбельно ассоциированного структурного гена, представляющего интерес, практически полностью в пыльцу растения при незначительна малой экспрессивна любую другую часть растения. Выражение "незначительно малая" означает Функциональную незначительность.

Ещё одной целью настоящего изобретения является получение молекул рекомбинантной ДНК, содержащих преимущественно тканевый промотор или специфически тканевый промотор, операбельно ассоциированный или связанный со структурным геном, представляющим интерес, в частности,, со структурным геном, кодирующим инсектицидный белок, и обеспечение экспрессии рекомбинантной молекулы в растение.

Следующей целью настоящего изобретения является получение трансгенных растений, которые действительно экспрессируют по меньшей мере один структурный ген, представляющий интерес, в преимущественна тканевый или специфически тканевый объект экспрессии.

В одном из специфических вариантов выполнения изобретения, приведенном в данном описании и защищаемом формулой изобретения, преимущественно тканевый или специфически, тканевый промотор операбельно связан со структурным геном, кодирующим инсектицидный белок, а растение устойчиво трансформировано с по меньшей мере одной такой рекомбинантной молекулой. Полученное в результате этого растение обладает сопротивляемостью по отношению к некоторым насекомым, которые питаются теми частями растения, в которые экспрессирован гены. Преимущественно структурные гены кодируют инсектицидные белки Bt. Более предпочтительными являются оптимизированные относительно кукурузы гены Bt IP.

Фиг.1 - сравнение полноразмерного нативного гена Bt cryIA(b) /BTHKURHD/, полноразмерного синтетического оптимизированного относительно кукурузы Гена cryIA(b) /flsynbt. fln/ и укороченного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt cryIA(b) /bssyn/. Из этого рисунка видно, что последовательность полноразмерного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена cryIA(b) соответствует последовательности нативного гена cryIA(b): приблизительно 2354 нуклеотида из 3468 /гомология составляет приблизительно 68%/ Фиг.2 - сравнение укороченного нативного гена Bt cryIA(b) /BTHKURHD/ и укороченного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt /bssyn/. Из этого рисунка видно, что последовательность укороченного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена cryIA(b) соответствует последовательности нативного гена cryIA(b): приблизительно 1278 нуклеотидов из 1947 /гомология составляет приблизительно 66%/.

Фиг.3 - сравнение последовательности чистого оптимизированного относительно кукурузы гена Bt /synIT.mze/ с укороченным синтетическим кукурузы геном Bt /bssyn/ и полноразмерным синтетическим оптимизированным относительно кукурузы геном Bt, модифицированным с целью включения рестрикционных участков, Способствующих конструированию гена /synful.mcd/.

Из этого рисунка видно, что последовательность укороченного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена cryIA(b), совпадает с последовательностью чистого оптимизированного относительно кукурузы гена cryIA(b): приблизительно 1913 нуклеотидов из 1947 /гомология составляет приблизительно 98%/.

Фиг.4 - сравнение нативного укороченного гена Bt cryIA(b) /BTHKURHD/ с укороченным синтетическим геном cryIA(b), описанным Рез lak и др. в PNAS USA, 88:3324-3328 /1991/PMONBT/ и укороченным синтетическим оптимизированным относительно кукурузы геном Bt /bssyn/. Из этого рисунка видно, что последовательность гена /PMONBT/ совпадает с последовательностью нативного гена Bt/bssyn/ приблизительно 1453 нуклеотидов из 1845 /гомология составляет приблизительно 79%/, в то время, как укороченный синтетический оптимизированный относительно кукурузы геHbt cryIA(b) совпадает с нативным геном cryIA(b): приблизительно 1209 нуклеотидов из 1845 /гомология составляет приблизительно 66%/.

Фиг.5 - сравнение укороченного синтетического гена cryIA(b), описанного Perlak и др. в PNAS USA,88:3324-3328 /1991/Рюизт / и укороченного синтетическое оптимизированного относительно кукурузы гена Bt cryIA(b)/bssyn/Hs этого рисунка видно, что последовательность гена PMONBT совпадает с последовательностью укороченного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt cryIA(b): приблизительно 1410 нуклеотидов из 1845 /гомология составляет приблизительно 77%/.

Фиг.6 - полноразмерный оптимизированный относительно кукурузы ген CryIB.

Фиг.7 - полнооазмерная гибридная частично оптимизированная относительно кукурузы последовательность ДНК гена CryIA(b), который содержится в pC1B4434. Синтетический участок состоит из нуклеотидов 1-1938 /аминокислоты 647-1155/. Точка слияния между синтетической, и нативной кодирующими последовательностями показана в последовательности знаком разрыва /-/.

Фиг.8 - карта pC1B4434.

Фиг.9 - полноразмерная гибридная оптимизированная относительно кукурузы последовательность ДНК, кодирующая теплоустойчивый белок CryIA(b), содержащийся в pC1B5511.

Фиг.10 - карта pC1B5511.

Фиг.11 - полноразмерная гибридная оптимизированная относительно кукурузы последовательность ДНК, кодирующая теплоустойчивый белок CryIA(b), содержащийся в pC1B5512.

Фиг.12 - карта pC1B5512.

Фиг.13 - полноразмерная оптимизированная относительно кукурузы последовательность ДНК, кодирующая теплоустойчив: белок CryIA(b), содержащийся в pC135513.

Фиг.14 - карта pC1B551P

Фиг.15 - полноразмерная оптимизированная относительно кукурузы последовательность ДНК, кодирующая

теплоустойчивый ген CryIA(b), содержащийся в pC1B5514.

Фиг.16 - карта pC1B5514.

Фиг.17 - карта pC1B4418.

Фиг.18 - карта pC1B4420.

Фиг.19 - карта pC134429.

Фиг.20 - карта pC1B4431.

Фиг.21 - карта pC1B4428.

Фиг.22 - карта pC1B4430.

Фиг.23А - таблица, содержащая данные об уровнях белка cryIA(b) в трансгенной кукурузе.

Фиг.23В - таблица, в которой обобщены результаты биологического испытания *Ostrinia nubilalis* на помете листа от потомства кукурузы, содержащей оптимизированный относительно кукурузы ген CryIA(b).

Фиг. 23С - таблица, содержащая данные об уровнях белка CryIA(b) в трансгенной кукурузе.

Фиг. 23Д,- таблица, в которой обобщены результаты биологического испытания *Ostrinia nubilalis* и *Diatraea* на биомассе листа от кукурузы, содержащей синтетический ген кукурузы, операбельно связанный с промотором сердцевин.

Фиг. 23Е - таблица, содержащая данные об экспрессии гена cryIA(b) в трансгенной кукурузе при использовании преимущественно сердцевинного промотора.

Фиг.24 - полная геномная последовательность ДНК гена кукурузы, кодирующая триптофан синтетаза-альфа субъединицу. Показаны интроны, эксоны, начала транскрипции и трансляции, начало и конец кДНК. Начало и конец кДНК обозначено знаком s, начало транскрипции обозначено как +1, поаймер расширяющий праймер обозначен как 73^{xxxxxxx} начало трансляции обозначено как +1, терминирующий ко-дон обозначен как +++, комплементарные пары /bp/ 1495-99 соответствуют рамке ССААТ, bp 1593-1598 соответствуют рамке ТАТАА, bp Р720-3725 соответствуют поли-А дополнительному сайту, № над подчеркнутыми последовательностями означает праймеры цепной поли-меразной реакции /FCR/+.

Фиг.25А, 25В, 25С, 25Д - анализ нозерн блотов, показывающие дифференциальную экспрессию гена кукурузы, кодирующего TrpA субъединицу в ткани кукурузы через 2-часовые, 4-часовые, 18-часовые и 48-часовые интервалы соответственно при температуре, равной -80°C с использованием усиливающих экранов DuPont Cronex. Буквами обозначены: Р - сердцевина, С - початок-кукурузы, BR - опорные корни, ES - стебель початка, LP- нижняя сердцевина, MP - средняя сердцевина, UP- верхняя сердцевина, S- семя, L - лист, R - корень, Р /слева сверху/ - совокупная сердцевина.

Фиг.26 - анализ нозерн блота, где два левых столбца показывают экспрессию гена кукурузы TrpA в лист /L/ и сердцевину /P/ инбредных линий Фанка 211Д и 5N984. Пять правых столбцов указывают на отсутствие экспрессии в полную РНК линии Фанка 211Д семени. Знаком S/1, 2, 3, 4 и 5/ обозначены семена через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после опыления. Буквами обозначено: L- лист, Р - сердцевина^V- семена через № недель после опыления.

Фиг.27 - анализ саузерн блота линии Фанка 211Д геномной ДНК с кукурузной кДНК 8-2TrpA /pC135600/, где 3 означает BamHI, E обозначает EcoRI, EV означает EcoRV, R означает Hind III, а означает sacI. Знаками IX, 5X, 10X обозначены эквиваленты реплики реконструированного гена.

Фиг.28А- анализ расширения праймера, который показывает начало транскрипции гена кукурузы, кодирующего TrpA субъединицу, и секвенирующего лэддера. Столбцы +1 и +2 характеризуют образцы IX + 0,5X реакции расширения праймера.

Фиг.28В - анализ защиты от РНКазы от +2 bp до +387 bp при температурах гибридизации, равных 42°C, 48°C, 54°C, через 16 часов экспонирования на плёнку при температуре, равной -80 °C с использованием усиливающих экранов DuPont Cronex.

Фиг.29 - карта исходного специфически пыльцевого клона ДНК второго типа. Показано субклонирование трёх Фрагментов EcoRI в блюскрипт-векторы для образования pC1B3168, pC1B3169 и II - 6.

Рис.30 - ДНК последовательность кукурузного гена к ДНК кодирующего специфически пыльцевую кальций-зависимую протеинкиназу, содержащаяся в фрагментах исходного клона кДНК второго типа с размером 1kb и 0,5kb. Показан сайт EcoRI, который делит фрагменты с длиной 1kb и 0,5kb. Указанная кДНК не является полноразмерной, при этом иницирующий сайт мРНК на карте располагается на 490 bp выше конца клона кДНК.

Фиг.31 - специфически тканевая экспрессия мРНК пыльцевой СДРХ. РНК из указанной кукурузной ткани 211Д денатурирована, подвергнута электрофорезу на геле агарозы, трансформирована на нитроцеллюлозу и пробиорана с фрагментом длиной 0,5 kb кДНК пыльцевой СДРХ. мРНК обнаруживается только в пыльце, в которой наблюдается сильный сигнал.

Фиг.32 - сравнение аминокислотной последовательности пыльцевой СДРХ выделенной белковой последовательности и белковой последовательности протеинкиназы 2 KPLSY, описанной Tobimatsu et al., - J. Biol. Chem. 263:16082-16086 /1988/. Для оценки последовательностей была использована отлаженная программа Allng содержащая пакет программ DNASTAR. Гомология к протеинкиназам обнаруживается на 2/3 5'-конца гена, т.е на фрагменте длиной 1,0kb.

Фиг.33 - сравнение аминокислотной последовательности пыльцевой СДРХ выделенной белковой последовательности и белковой последовательности кальмодулина человека, описанной plsher et al., j. Biol. Chem. 263:17055-17062 /1988/. Гомология с кальмодулином находится на 1/3 3'-конца гена, т.е-на фрагменте длиной 0,5kb .

Фиг.34 - сравнение аминокислотной последовательности пыльцевой СРДХ выделенной белковой

последовательности и СРДК сои. Гомология наблюдается на протяжении всего гена.

Фиг.35 - последовательность кукурузного гена специфически пыльцевой СРДК. Перед иницирующим сайтом мРНК показана последовательность длиной 1,4kb. Позиции семи экзонов и шести интронов показаны под соответствующей последовательностью ДНК. Показан сайт полиаденилирования в клоне кДНК.

Фиг.36 - карта pC1B4433.

Фиг.37 - полноразмерная гибридная оптимизированная относительно, кукурузы последовательность, кодирующая теплоустойчивый белок cryIA(b).

Фиг.38 - карта pC1B5515.

Описание последовательностей.

Последовательность 1 - последовательность ДНК полноразмерного нативного гена cryIA(b).

Последовательность 2 - последовательность ДНК полноразмерного чистой оптимизированного относительно кукурузы синтетического генаBt cryIA(b)

Последовательность 3 - последовательность ДНК укороченного оптимизированного относительно кукурузы синтетического генаBt cryIA(b) с длиной, равной приблизительно 2 kb.

Последовательность 4 - последовательность ДНК полноразмерного оптимизированного относительно кукурузы синтетического генаBt cryIA(b).

Последовательность 5 - последовательность ДНК синтетического гена Bt с длиной, равной 2 kb согласно Perlak и др.

Детальное описание изобретения.

Для однозначности понимания терминологии в смысле, используемом в описании и формуле настоящего изобретения, приняты следующие определения:

Преимущественно кукурузный кодон: преимущественный кодон - это кодон, который преимущественно эксгибинируется клеткой-хозяином при использовании нуклеотидных кодонов для точного определения заданной аминокислоты. Преимущественный кодон для аминокислоты определённого хозяина представляет собой единичный кодон, который наиболее часто кодирует указанную аминокислоту указанного хозяина. Преимущественно кукурузный кодон для данной аминокислоты может быть получен из известных генных последовательностей кукурузы. Например, использование кукурузного кодона для 28 генов кукурузных саженцев приведено в Таблице 4 /Murray te al., Nucleic Acids Reseach,17:477-498 /1989/, на которую делаются ссылки в данном описании. Например, преимущественно кукурузный кодон для аланина представляет собой GCC, так как согласно объединённым последовательностям 26 генов кукурузы n &Murray и др., этот кодон кодирует аланин в 36% случаев, в то время, как GCG - в 24%, GCA - в 13%, а GCT - 27% случаев.

Последовательность, оптимизированная относительно чистой кукурузы: оптимизированный ген или последовательность ДНК соответствуют гену, в котором нуклеотидная последовательность нативного гена модифицирована с целью использования преимущественных кодонов для кукурузы. Например, синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген Bt cryIA(b) является геном, в котором нуклеотидная последовательность нативного генаBt cryIA(b) модифицирована так, что используемые кодоны представляют собой преимущественно кукурузные кодоны, как это описано выше. Ген, оптимизированный относительно чистой кукурузы, является геном, в котором нуклеотидная последовательность содержит 100 процентов последовательностей преимущественно кукурузного кодона для данного полипептида. Например, оптимизированный относительно чистой кукурузы генBt cryIA(b) является геном, в котором нуклеотидная последовательность содержит 100 процентов последовательностей преимущественно кукурузного кодона и кодирует полипептид с той же самой аминокислотной последовательностью, что и последовательность, выработанная нативным геном Bt cryIA(b). Чистая нуклеотидная последовательность оптимизированного гена может быть также изменена с тем, чтобы позволить манипулировать геном, например, путём замены нуклеотида для образования или исключения рестрикционных сайтов. Чистая нуклеотидная последовательность оптимизированного гена может быть также изменена для исключения потенциально вредных процессирующих сайтов или сайтов распознавания интрона.

Признано, что могут быть также использованы "частично оптимизированные относительно кукурузы" последовательности. Понятие "частично оптимизированная относительно кукурузы" означает, что кодирующий участок гена является химерным участком /гибридом/, содержащим последовательности, выделенные из нативного инсектицидного гена, и последовательности, оптимизированные для экспрессии в кукурузу. Частично оптимизированный ген экспрессирует инсектицидный белок на уровне, достаточном для борьбы с насекомыми-вредителями, причём такая экспрессия осуществляется на более высоком уровне, чем достигаемая при использовании только нативных последовательностей. Частично оптимизированные относительно кукурузы последовательности включают те из них, которые содержат по меньшей мере около 5% оптимизированных последовательностей.

Полноразмерные геныBt: этот термин относится к последовательностям ДНК, содержащим полную нуклеотидную последовательность, необходимую для кодирования полипептида, образованного нативным геном Bt. Например, нативный ген Bt cryIA(b) имеет длину, равную приблизительно 3,5 kb и кодирует полипептид с длиной, составляющей приблизительно 1150 аминокислот. Полноразмерный синтетический ген Bt cryIA(b) предположительно имеет длину, равную приблизительно 3,5kb.

Укороченные гены Bt: этот термин относится к последовательностям ДНК, содержащим нуклеотидную последовательность с меньшей, чем полная, длиной, необходимую для кодирования полипептида, образованного нативным геномBt, но которая кодирует участок активного токсина полипептида. Например, укороченный синтетический ген с длиной, равной приблизительно 1,9kb, кодирует участок активного токсина

полипептида таким образом, что белковый продукт проявляет инсектицидную активность.

Преимущественно - тканевый промотор: термин "преимущественно тканевый промотор" используется для указания на то, что данная регуляторная последовательность стимулирует более высокий уровень транскрипции связанного структурного гена или кодирующей последовательности ДНК, или экспрессии продукта связанного гена, как на это указывает любая обычная проба РНК или белка, или для указания на то, что данная последовательность ДНК показывает некий характерный эффект, т.е., что транскрипция связанных последовательностей ДНК или экспрессия продукта гена больше в какой-то ткани, чем во всех других тканях растения.

Термин "Специфически - тканевый промотор" используется для указания на то, что данная регуляторная последовательность ДНК стимулирует транскрипцию связанной кодирующей последовательности ДНК в основном полностью в одной или более тканях растения, или в одном виде ткани, например зеленой ткани, тогда как во всех других тканях или видах тканей растения транскрипция указанной связанной кодирующей последовательности ДНК в основном не осуществляется.

Настоящее изобретение направлено на создание последовательностей ДНК, оптимизированных для экспрессии в растения, особенно в кукурузу. В предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения последовательности ДНК кодируют продукт - инсектицидного токсина, преимущественно полипептид, разделяющий в основном аминокислотную последовательность инсектицидного кристаллического белкового токсина, обычно производимого *Bacillus thuringiensis*. Синтетический ген может кодировать укороченный или полноразмерный инсектицидный белок. Особенно предпочтительными являются синтетические последовательности ДНК, которые кодируют полипептид, эффективные против насекомых вида *Lepidoptera* и *Coleoptera* и синтетические последовательности ДНК, кодирующие полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, в основном ту же, что и аминокислотная последовательность кристаллических белковых токсинов *Bacillus thuringiensis* разновидности *kurstaki* HD-1.

Настоящее изобретение направлено на создание синтетических последовательностей ДНК, эффективных для обеспечения высокоинтенсивной экспрессии активных инсектицидных белков в растения, преимущественно в протоплазму кукурузы, клетки растений и растения. Синтетические последовательности ДНК согласно настоящему изобретению модифицированы таким образом, чтобы иметь сходство с геном кукурузы в смысле использования кодона и содержания G + C. В результате этих модификаций синтетические последовательности ДНК согласно настоящему изобретению не содержат потенциально процессирующих сайтов, которые присутствуют в нативном гене. Полученные в результате синтетические последовательности ДНК /синтетические кодирующие последовательности Bt IP/ и векторы трансформации растения, содержащие указанную синтетическую последовательность ДНК/ синтетические гены Bt IP/ приводят к неожиданно увеличенной экспрессии синтетического гена Bt IP по сравнению с нативным геном Bt IP, исходя из продуцирования инсектицидного белка в растениях, особенно в кукурузе. Высокий уровень экспрессии приводит к тому, что клетки кукурузы и растения проявляют устойчивость к чешуйчатокрылым насекомым, особенно к Европейскому зерновому точильщику и *Diatraea saccharalis*, сахарному точильщику.

Синтетические последовательности ДНК согласно настоящему изобретению предназначены для кодирования инсектицидных белков из *Bacillus thuringiensis*, однако оптимизирована для экспрессии в кукурузу, исходя из содержания G + C и использования кодонов. Например, для осуществления обратной трансляции аминокислотной последовательности токсина, продуцированного геном *cryIA(b)* *Bacillus thuringiensis* разновидность *kurstaki* HD-1, применяя только наиболее предпочтительные кодоны кукурузы, используется таблица использования кодонов кукурузы, приведенная Murray et al, см. выше. Обратной транскрипцией последовательности ДНК считается оптимизированная относительно чистой кукурузы последовательность, которая показана как Последовательность 4. Указанная последовательность затем модифицируется для исключения сайтов эндонуклеазы рестрикции, которые являются нежелательными, и для создания требуемых сайтов рестрикции эндонуклеазы. Указанные модификации предназначены для облегчения клонирования гена без ощутимого изменения использования кодонов или оптимизированной относительно кукурузы последовательности. Во время процесса клонирования с целью облегчения клонирования гена проводятся другие модификации на участке, который по-видимому проявляет особую восприимчивость к ошибкам, индуцированным при клонировании за счет цепной полимеразной реакции /PCR/. Конечная последовательность синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt IP показана как Последовательность 2. Сравнение синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt IP с нативным геном *cryIA(b)* Bt *kurstaki* показана на фиг.1.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения белок, продуцированный* синтетической последовательностью ДНК, является эффективным средством борьбы с насекомыми вида *Lepidoptera* или *Coleoptera*. В наиболее предпочтительном варианте полипептид, закодированный синтетической последовательностью ДНК, содержит в основном полноразмерную или укороченную аминокислотную последовательность инсектицидного белка, обычно продуцируемого *Bacillus thuringiensis* разновидности *kurstaki* HD-1. В конкретном варианте исполнения синтетическая последовательность ДНК кодирует полипептид, содержащий существенно укороченную аминокислотную последовательность белка *CryIA(b)* Bt.

Инсектицидные белки согласно изобретению экспрессируются в растение в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми-вредителями, т.е. в насекоморегулирующих дозах. Признано, что степень экспрессии инсектицидного белка в растение, необходимая для борьбы с насекомыми, может значительно изменяться в зависимости от особенностей растения, вида насекомых, факторов окружающей среды и т.п. В общем случае популяция насекомых будет поддерживаться ниже экономически обоснованного порога, который изменяется от

растения к растению. Например, для борьбы с Европейским зерновым точильщиком, воздействующим на кукурузу, экономический порог составляет 0,5 яйца/масс на растение, что приводит к появлению приблизительно 10 личинок на растение.

Способы, предлагаемые настоящим изобретением, могут быть использованы для борьбы с широким кругом насекомых, включая, но не ограничиваясь нижеперечисленным: личинки, повреждающие корни, гусеница озимой совки, личинки бабочки-ночницы, жук-щелкун, тля растительная, зерновые точильщики, в частности, Европейский зерновой точильщик, сахарный точильщик, Юго-западный зерновой точильщик и т.д.

В предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения синтетическая кодирующая последовательность ДНК, оптимизированная для экспрессии в кукурузу, содержит G + C в процентном отношении больше, чем последовательность нативного гена *cryIA(b)*. Предпочтительно, чтобы процентное содержание G + C по меньшей мере составляло приблизительно 50 процентов, более предпочтительно - по меньшей мере около 60 процентов. Особенно предпочтительно, чтобы содержание G + C составляло приблизительно 64 процента.

В другом предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения синтетическая кодирующая последовательность ДНК, оптимизированная для экспрессии в кукурузу, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 90-процентную гомологию с оптимизированной относительно "чистой" кукурузы нуклеотидной последовательностью нативного белка *cryIA(b)* *Bacillus thuringiensis*, более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 95-процентную гомологию, наиболее предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 98-процентную гомологию.

Другие предпочтительные варианты выполнения настоящего изобретения включают синтетические последовательности ДНК, имеющие в основном последовательность ДНК Последовательности ID № 4, также как и её мутанты или варианты; трансформирующие векторы, содержащие в основном последовательность ДНК Последовательности ID № 4; и выделенные последовательности ДНК, полученные из плазмид pCIB440E, pC1B4407, pC1B4413, pC1B4414, pC1B4416, pC1B4417, pC1B4418, pC1B4419, pC1B4420, pC1B4421, pC1B4423, pC134434, pC114429, pC1B4431, pC1B4433. Наиболее предпочтительными являются выделенные последовательности ЛПК, полученные из плазмид pC1B4418 и pC1B4420, pC1B4434, pC1B4429, pC1B4431 и pC1B4433.

Для конструирования одной из оптимизированных относительно кукурузы последовательностей ДНК согласно настоящему изобретению олигонуклеотиды синтетической ДНК создаются со средней длиной, равной приблизительно 80 нуклеотидов. Указанные олигонуклеотиды предназначены для гибридизации с целью получения, фрагментов, содержащих различные четверти укороченного гена токсина. Олигонуклеотиды для данной четверти гибридизируются и усиливаются с помощью PCR. Затем четверти клонируются и клонированные четверти секвенируются с тем, чтобы выявить те из них, которые содержат необходимые последовательности. В случае, касающемся четвертой четверти, гибридизированные олигонуклеотиды клонируются непосредственно без усиления PCR. После выявления всех клонов четырех четвертей, которые содержат открытые считывающие рамки, собирается неповрежденный ген, кодирующий активный инсектицидный белок. Затем собранный ген может испытываться на инсектицидную активность против любого представляющего интерес насекомого, включая Европейского зернового точильщика /ECB/ и сахарного точильщика / примеры 5A и 5B соответственно/. При получении полностью функционального гена он вновь секвенируется для подтверждения его первичной структуры. Находит, что полностью функциональный ген обеспечивает 100% уничтожение при биопробе против ECB. Полностью функциональный ген также модифицируется для экспрессии в кукурузу.

Оптимизированный относительно кукурузы ген испытывается с помощью анализа транзientной экспрессии. Кодирующая последовательность нативного *cryIA(b)* Bt для активного инсектицидного токсина не экспрессируется на подающемся обнаружению уровне в системе транзientной экспрессии кукурузы. Таким образом, уровень экспрессии синтетического гена может быть определен. За счёт использования существующих способов экспрессия белка в трансформированные растения может быть увеличена по меньшей мере приблизительно от 100 до приблизительно 50000 раз, более характерно - по меньшей мере от приблизительно 1000 до по меньшей мере приблизительно 22000 раз.

Увеличение экспрессии инсектицидного гена до эффективного уровня не требует обработки нативного гена по всей последовательности. Эффективность экспрессии может быть достигнута за счёт обработки только участков последовательностей, необходимых для получения увеличенной экспрессии. Может быть получен полноразмерный оптимизированный относительно кукурузы ген *CryIA(b)*, содержащий белок нативной *cryIA(b)* последовательности. Например, на фиг.7 показан полноразмерный оптимизированный относительно кукурузы ген *cryIA(b)*, который представляет собой синтетически-нативный гибрид. Другими словами, приблизительно 2kb гена /нуклеотиды 1-1938/ в кукурузе оптимизированы, т.е. являются синтетическими. Оставшиеся, С-терминальные нуклеотиды 647-1155, идентичны соответствующей нативной последовательности гена *cryIA(b)*. Конструкция показанного на рисунке гена описана ниже в примере 6.

Общепризнанно, что путем использования приведенных в настоящем описании способов могут быть сконструированы и испытаны на экспрессию различные синтетические/нативные гибриды. Важным аспектом гибридной конструкции является то, что с целью борьбы с насекомыми-вредителями белок продуцируется в значительных количествах. Указанным способом могут быть идентифицированы критические участки гена, которые синтезируются, используя преимущественные кодоны. Синтетические последовательности могут быть связаны с нативными последовательностями, как это показано в нижеприведенных примерах. В общем случае, N -концевые участки или процессирующие сайты, с целью увеличения экспрессии в растения, могут быть

синтезированы и замещены в нативной кодирующей последовательности.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения оптимизированные относительно кукурузы гены, кодирующие белок *cryIA(b)*, могут быть подвержены манипуляциям для придания кодируемому белку большей теплоустойчивости или термостойчивости по сравнению с нативным белком *cryIA(b)*. Показано, что ген *cryIA(b)* обнаруженный в *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1 содержит делецию из 26 аминокислот, по сравнению с белками *cryIA(a)* и *cryIA(c)*, в -COOH половине белка. Указанная делеция приводит к получению термочувствительного белка *cryIA(b)*. См. Gelser, патент ЕПВ 0 440 581, озаглавленный "Термостойчивый *Bacillus thuringiensis* -Токсин". Репарация указанной делеции соответствующим участком из белка *cryIA(a)* или *cryIA(c)* повышает термостойчивость репарационного белка. Конструкции полноразмерного модифицированного синтетического гена *cryIA(b)* предназначены для введения последовательностей, кодирующих недостающие аминокислоты в соответствующем месте последовательности без изменения считывающей рамки и без изменения остатка белковой последовательности. Полноразмерный синтетический вариант гена собирается путём синтеза ряда кассет двухцепочечной ДНК, каждая из которых имеет длину, равную приблизительно 300bp, используя стандартную методику синтеза ДНК и ферментативных реакций. Считают, что репарационный ген кодирует "термостойчивый" или "термочувствительный" белок *cryIA(b)*, т.к. он сохраняет большую биологическую активность, чем его нативный двойник при воздействии высоких температур. Специфические последовательности оптимизированных относительно кукурузы термостойчивых генов *cryIA(b)*, кодирующие термостойчивые белки, показаны на фиг.9, 11, 13, 15, а также описаны в нижеприведенном примере 7.

Настоящее изобретение включает оптимизированные относительно кукурузы кодирующие последовательности, которые кодируют другие полипептиды, включая инсектицидные полипептиды, полученные НС ОТ *Bacillus thuringiensis*, или инсектицидные белки из других источников. Например, гены *cryIB* могут быть оптимизированы относительно кукурузы, а затем целенаправленно введены в растения, в частности, кукурузу. Последовательность оптимизированного относительно кукурузы гена *cryIB*, сконструированного в соответствии с настоящим изобретением, показана на фиг.6.

Оптимизация гена *Bt IP* для экспрессии в кукурузу, используя преимущественно кукурузный кодон согласно настоящему изобретению, приводит к значительному возрастанию экспрессии инсектицидного гена. Следует ожидать, что могут быть синтезированы другие гены, используя преимущества растительных кодонов для улучшения их экспрессии в кукурузу или другие растения. Использование преимущества кукурузного кодона является возможным способом оптимизации и максимизации экспрессии чужеродных генов в кукурузу. Такие гены включают те из них, которые используются в качестве селектирующих или метящих маркеров при трансформации кукурузы, а также гены, обеспечивающие гербецидоустойчивость, и гены, обеспечивающие устойчивость к болезням и к воздействию насекомых.

Синтетический ген *cryIA(b)* также вводится в *Agrobacterium* векторы, которые применяются для трансформации большого разнообразия видов двудольных растений. /пример 44/. Растения, целенаправленно трансформированные синтетическими *Agrobacterium* векторами, показывают инсектицидную активность.

Нативный ген *cryIA(b)* *Bt* имеет довольно большое количество А + Т. Содержание G + C в полноразмерном нативном гене *cryIA(b)* *Bt* составляет приблизительно 39%. Содержание G + C в укороченном нативном гене *cryIA(b)* *Bt*, имеющем длину, равную приблизительно 2kb, составляет примерно 37%. Обычно участки, кодирующие кукурузу, имеют тенденцию к преобладающему содержанию 5 G + C. Модификации гена *cryIA(b)* *Bt* позволяют получить участок, кодирующий синтетический *IP*, содержание G + C в котором превышает 50%, а гомология на уровне ДНК с нативным геном *cryIA(b)* составляет приблизительно 65%. Белок, закодированный указанным синтетическим геном *CryIA(b)*, имеет 100-процентную гомологию с нативным белком и, таким образом, полностью сохраняет свои функции в смысле инсектицидной активности. Укороченный синтетический ген *cryIA(b)* *IP* имеет длину, равную приблизительно 2kb, и кодирует участок активного токсина нативного инсектицидного белка *cryIA(b)* *Bt* kurstaki. Длина белка, закодированного укороченным синтетическим геном *cryIA(b)*, составляет 648 аминокислот.

Синтетические гены согласно настоящему изобретению применяются для усиления экспрессии в трансгенные растения, наиболее предпочтительно в трансформированную кукурузу. Трансгенные растения в соответствии с настоящим изобретением могут использоваться для экспрессии инсектицидного белка *cryIA(b)* на высоком уровне, обеспечивая их устойчивость к насекомым-вредителям, особенно к жесткокрылым или чешуйчатокрылым насекомым, преимущественно к Европейскому зерновому точильщику /ECB/ и сахарному точильщику.

Согласно настоящему изобретению кодирующая последовательность ДНК синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена может находиться под контролем регуляторных элементов, например, промоторов, которые направляют экспрессию кодирующей последовательности. Такие регуляторные элементы включают, например, функциональные промоторы однодольных растений /кукурузы и других однодольных растений/, обеспечивающих экспрессию гена в различные части кукурузного саженца. Регуляторные элементы - могут быть конститутивными, т.е. они могут стимулировать непрерывную и устойчивую экспрессию гена. Такие промоторы включают, не ограничиваясь нижеперечисленным, промотор *CaMV 19S*, промотор *SdMV 35S*, *A. tumefaciens* промоторы, например, промоторы синтетазы октопина, промоторы синтетазы маннопина, промоторы синтетазы нопалина или промоторы синтазы другого спина, убиквитинные промоторы, актиновые промоторы, гистоновые промоторы и тубулиновые промоторы. Регуляторный элемент может представлять собой преимущественно тканевый промотор, т.е. промотор, способный стимулировать более высокую экспрессию в определённые ткани растения, чем в другие ткани.

Преимущественно тканевый промотор предпочтительно направляет более высокую экспрессию синтетического гена в листья, стебли, корни и/или пыльцу, чем в семя растения. Регуляторный элемент может быть также индуцируемым, например, за счёт термостресса, водного стресса, питания насекомого или химической индукции, или же может быть эволюционно регулируемым. Специалистам в данной области известны множество промоторов, экспрессия которых изменяется в ткани специфическим образом. Примером одного из таких промоторов является фосфоэнолпируват карбоксилаза /PEPC/ кукурузы, которая является Специфическим для зеленой ткани промотором. См., например, Hudspeth, R.L. HGryla, J.W., Plant Molecular Biology 12: 579-589, 1989/. Другими специфическими для зеленой ткани промоторами являются хлорофилл а/б связывающие белок промоторы и промоторы небольших субъединиц RubisCO.

Настоящее изобретение направлено также на создание выделенных и очищенных преимущественно-сердцевинных промоторов. В предпочтительных случаях преимущественно-сердцевинные промоторы выделяются из травянистых однодольных растений, таких как сахарный тростник, рис, ячмень рута, сорго, пшеница и кукуруза; более предпочтительными являются промоторы, выделенные из кукурузных саженцев.

В предпочтительном варианте преимущественно-сердцевинный промотор наделяется из растительного гена TgrA; R наиболее предпочтительном варианте промотор выделяется из кукурузного гена TgrA. Т.е. промотор в своём нативном состоянии является оперативно связанным с геном кукурузы, кодирующим триптофан синтаза-альфа субъединицу /в последующем "TgrA"/. Закодированный белок имеет молекулярную массу, равную приблизительно 38кД. Вместе с другой альфа-субъединицей и двумя бета-субъединицами TgrA образует многомерный фермент, триптофан синтезу. Каждая субъединица может действовать самостоятельно, но более эффективно они функционируют совместно. TgrA катализирует трансформацию индоло-глицеролфосфата в индол. До настоящего изобретения ни кукурузный ген TgrA, ни закодированный белок, не были выделены из какого-либо растения. Arabidopsis thaliana ген, кодирующий триптофан синтаза бета субъединицу был клонирован, как это описано у Wright et al., The Plant Cell, 4:711-719 /1992/. Чисто кукурузный ген TgrA не имеет гомологии с геном, кодирующим бета субъединицу.

Настоящее изобретение обеспечивает также получение очищенных специфически-пыльцевых промоторов из растительного гена, кодирующего кальций-зависимую фосфат киназу /CPDK/. Другими словами, в своём нативном состоянии промотор оперативно связан с растительным геном CPDK. В предпочтительном варианте промотор выделяют из кукурузного гена CPDK. Термин "специфически-пыльцевой" означает, что экспрессия оперативно связанного структурного гена, представляющего интерес, в основном осуществляется только /т.е. поактически полностью/ в пыльцу растения и в незначительной степени по все другие части растения. Под термином "CPDK" подразумевают протеин киназу растения, которая имеет высокую степень сродства для кальция, но не для кальмодулина, и для своей каталитической активности требует кальция, а не кальмодулин.

Для получения преимущественно-тканевых или специфически-тканевых промоторов гены, кодирующие РНК специфически-тканевого переносчика /мРНК/, могут быть получены за счёт дифференциального скрининга библиотеки кДНК. Например, преимущественно-сердцевинная кДНК может быть получена при дифференциальном скрининге библиотеки сердцевинной кДНК, используя пробы кДНК, полученные из мРНК сердцевин и семени. См. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook et al., eds. Cold Spring Harbor Press: New York (1989).

С другой стороны, специфически-тканевые промоторы могут быть получены путем получения специфически-тканевых белков, секвенирования N-концов, синтеза олигонуклеотидных проб и использования проб для скрининга библиотеки кДНК. Такие операции поясняются примерами, описанными в разделе, который касается экспериментов по выделению специфически-пыльцевого промотора.

Объем притязаний настоящего изобретения, касающихся преимущественно-сердцевинных и специфически-пыльцевых промоторов, включает в себя функционально активные фрагменты полноразмерного промотора, которые также способны направлять преимущественно-сердцевинную или специфически-пыльцевую транскрипцию, соответственно, связанных структурных генов. Функционально активные фрагменты последовательности ДНК промотора могут быть выделены из последовательности ДНК промотора с помощью нескольких известных специалистам способов, например, расщеплением последовательности ДНК промотора, используя рестриктазы, синтезируя в соответствии с последовательностью последовательности ДНК промотора, или могут быть получены с помощью технологии -PCR. Kullis et al., KeCl. Rnzymol. 155:335-350 (1987); Erllich (ed.), PCR Technology, Stockten Press (New York 1989).

Кроме того, в объем притязаний настоящего изобретения включены преимущественно-сердцевидные-и специфически-пыльцевые промоторы, эквивалентные полноразмерным промоторам. Другими словами, различные нуклеотиды или группы нуклеотидов могут быть модифицированы, введены или удалены способом, который не прекращает активность промотора в соответствии с известными способами.

Преимущественно-сердцевинный промотор, полученный из кукурузного гена, TgrA показан на фиг.24. Специалисты в данной области, обладая информацией о такой последовательности, должны признать, что преимущественно-сердцевинные промоторы, включенные в объем притязаний настоящего изобретения, могут быть получены из других растений путем пробирования библиотек сердцевин из указанных растений зондами, выделенными из кукурузного структурного гена TgrA. Зонды, сконструированные из последовательностей, которые имеют высокую степень консервации среди генов, кодирующих TgrA субъединицу, как это описано в примере 17, являются предпочтительными. Другие специфически-пыльцевые промоторы, которые в своём нативном состоянии связаны с генами CDPK растений, отличных от кукурузы, могут быть выделены аналогичным образом, используя, выделенные из сохраненных участков кукурузного гена CPDK с целью

пробиорования пыльцевых библиотек.

В другом варианте настоящего изобретения преимущественно - сердцевинный или специфически-пыльцевой промотор оперативно связан с последовательностью ДНК, т.е. со структурным геном, кодирующим белок, представляющий интерес, с целью образования молекулы рексминантной ДНК или химерного гена. Выражение "оперативно связанный с" известно специалистам в данной области и может быть использовано наряду с выражениями "оперативно ассоциированный с", "связанный с" или "слитый с".

Структурный ген может быть гомологичен или гетерологичен к первоначальному промотору и/или целевому растению, в который он трансформируется. Независимо от происхождения последовательность ассоциированной ДНК экспрессируется в трансформированное растение в соответствии с экспрессирующими свойствами промотора, с которым она связана. Таким образом, выбор последовательности ассоциированной ДНК должен вытекать из потребности иметь последовательность, экспрессированную указанным способом. Примерами гетерологичных последовательностей ДНК являются последовательности, которые кодируют инсектицидные белки, например, белки или полипептиды токсичных или, оказывающих ингибирующее воздействие на насекомых или других паразитных артроподов растений или растительных патогенов, таких как низшие грибы, бактерии и нематоды. Указанные гетерологичные последовательности ДНК кодируют белки, такие как маггаинины Zasloff, PNAS USA, 84:5449 D987/, сикропины, Hultmark et al., Bug. J. Blochem. 127:207-217 /1982/, аттацины, Hultmark et al, EMBO J. 2:571-576 /1983/, мелиттин, грамицидин S, Katsu et al., Blochem. Biophys. Acta, 939: 57-63 /1988/; белки натруенного канала и синтетические фрагменты, Oikl et al. PNAS USA, 85:2395-2397 /1988/; альфа-токсин *Staphylococcus aureus* Tobkes et al., Biochem., 24:1915-1920 /1985/; аполилобелки и их фрагменты, Knott et al., Science 230:37 /1985/; Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc., 107:7087 /1985/; аламетицил и разновидность синтетических амфипатических пептидов, Kalser et al., Ann. Rev. Biophys. Biochem. 16:561-581 /1987/, лектины, Lis et al., Ann. Rev. Biochem. 55: 35-68 /1986/; ингибиторы протеазы и амилазы; инсектицидные белки из *Bacillus thuringiensis*, особенно дельта-эндотоксины из *B. thuringiensis*; и из других бактерий или грибов.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения преимущественно сердцевинный промотор, полученный из кукурузного гена, кодирующего TrpA субъединицы, или специфически-пыльцевой промотор, полученный из кукурузного гена CDPK, оперативно связаны с гетерологической последовательностью ДНК, кодирующей *Bacillus thuringiensis* "v.t." инсектицидный белок. Такие белки и соответствующие структурные гены хорошо известны специалистам в данной области. См. Hofte and Whiteley, Microbiol. Reviews, 53:242-255 /1989/.

Поскольку признано, что любой промотор, способный направлять экспрессию, может быть использован, предпочтение в использовании отдается скорее гетерологическим промоторам, чем нативизму промотору белка, представляющего интерес. Этим способом могут быть сконструированы нуклеотидные последовательности химер, которые могут быть определены на основе растения, подлежащего трансформации, а также насекомого-вредителя. Например, для борьбы с кукурузными насекомыми-вредителями промотор однодольного растения или кукурузы может быть оперативно связан с белком Bt. Промотор кукурузы может выбираться из преимущественно тканевых или специфически тканевых промоторов, например, преимущественно сердцевинных и специфически пыльцевых промоторов, соответственно, как указано в данном описании.

В некоторых случаях предпочтительным считается трансформация клетки растения конструкцией, включающей более, чем один химерный ген. Таким образом, например, единичное растение могло быть трансформировано преимущественно сердцевинным промотором, оперативно связанным с белком Bt, а также специфически пыльцевым промотором, оперативно связанным с белком Bt. Трансформированные растения обычно экспрессируют белки Bt в сердцевину и пылецу растения и в меньшей степени в корнях, другие корневые чехлики и опорные корни.

По различным другим причинам, в частности, для управления потенциальной насекомостойчивостью, образующейся в инсектицидных балках, экспрессированных в растение, целесообразно в одно и то же растение экспрессировать более одного инсектицидного белка /IP/. Можно было бы экспрессировать в одни и те же ткани два различных гена /например, два различных дельта-эндотоксина, выделенных из *Bacillus thuringiensis*, которые связывают различные рецепторы в желудке целевого насекомого/, или можно выборочно экспрессировать указанные два токсина в различные ткани одного и того же растения, используя специфически-тканевые промоторы. Экспрессирование двух генов Bt /или любых двух инсектицидных генов/ в одно и то же растение, используя три различных специфически - тканевых промотора, вызывает затруднения к получению растения, представляющего собой требуемый фенотип. Три различных промотора, управляющие двумя различными генами, создают шесть различных инсектицидных генов, которые требуется ввести в растение в одно и то же время. С целью идентификации трансформированных растений при трансформации необходим также селектируемый маркер. Это означает введение семи различных генов в растение в одно и то же время. Наиболее целесообразным является интеграция всех генов, особенно инсектицидных генов, в одном и том же локусе генома растения, так что они ведут себя как единый ген, обладающий свойственным ему признаком, а не как множество генов, что труднее проследить при выведении коммерческих гибридов. Общее количество генов может быть уменьшено за счет использования различной специфически тканевой экспрессии различных инсектицидных белков.

Например, путем слияния *cryIA(b)* с промоторами пыльцы и Фосфоенолпируваткарбоксилазы /PEP карбоксилазы/ можно получить экспрессию этого гена в зеленые ткани и пылецу. Слиянием преимущественно-сердцевинного промотора с *cryIB* дельта эндотоксином из *Bacillus thuringiensis* возможно

осуществить экспрессию указанного инсектицидного белка в сердцевину трансформированного растения в значительной степени, но это не распространяется на ткани семени. Трансформация растения тремя генами, PEP карбоксилаза/ cryIA(b), пыльца/ cryIA(b), и сердцевина/ cryIB позволяет пррдуцировать растение, экспрессирующее два различных инсектицидных эндотоксина Bt в различные ткани одного и то же растения. Ген cryIA(b) может быть экспрессирован во "внешние" ткани растения /особенно кукурузы/, т.е. з те ткани, которые поедает Европейский зерно-рой точильщик сразу же после его пояления из личинки. Если бы указанный зерновой точильщик оказался устойчивым к гену cryIA(b) и смог бы внедриться в стебель растения после поедания ткани листа и/или пыльцы, он встретился бы с дельта-эндотоксином cryIB и подвергся бы воздействию второго инсектицидного компонента. Таким образом, можно дифференциально экспрессировать два различных инсектицидных компонента в одно и то же растение и уменьшить общее число генов, необходимых для введения в качестве генетической единицы, одновременно обеспечивая защиту от создания устойчивости у насекомого к одному инсектицидному компоненту.

Аналогичным образом, растение может быть трансформировано конструкциями, кодирующими более одного вида инсектицидного белка для борьбы с различными насекомыми. Специалистам в данной, области понятно, что может быть создано множество вариантов таких конструкций.

Молекулы рекомбинантной ДНК согласно настоящему изобретению могут быть получены за счет манипуляции различными элементами, размещая их с различной ориентацией. Таким образом, для соединения фрагментов ДНК могут быть использованы адаптеры и линкеры. Могут быть проведены другие манипуляции с целью получения подходящих рестрикционных сайтов, удаления рестрикционнх сайтов или избыточных ДНК. Такие виды манипуляций могут выполняться известными способами. См. Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, second edition, 1989. Например, для связывания и лигпрсвзнпя могут применяться такие способы, как рестрикция, устранение или усиление избыточности при получении тупых концов, лигирование линкеров, комплементарных концов Фрагментов ДНК. ^М. выше, Sambrook et al.

В зависимости от способа, с помощью которого молекула вводится в геном выбранного растения, в молекулу рекомбинантной ДНК могут включаться другие функциональные последовательности ДНК. Например, в случае Agrobacterium-опосредствованной трансформации, если для Трансформации клеток растения используется Ti- или Ri -плазмида, правая и лйвая границы T-ДНК Ti- и Ri-плазмидн связываются в качестве фланкирующих участков с экспрессирующей кассетой. Agrobacterium tumefaciens-опосредствованная трансформация растений описана Horsch et al., science, 225:1229 /1985/; Mar-ton, Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants , 1:514-521 /1984/; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offset -- Drukkerij Kanters B.V.Alblasserdam, 1985, Chapter V Fraley et al.,Crlt.Rev.Plant Sel4:1-46; и An et al., Bmbo J ., 4:277-284 /1988/.Молекулы рекомбинантной ДНК согласно настоящему изобретению с целью облегчения селекции в рекомбинантных клетках растения могут включать также маркерный ген. Например, такие маркёры отмечают устойчивость к биоцидам, таким как канамицин, гидромицин, хлорамфеникол, парамомицин, метотрексат, блеомицин, или к гербецидам, таким,как имидазалон, сульфонидмочевина, глифосат, фосфинотрицин или биалофос. Маркерные гены хорошо известны специалистам в данной области.

В другом варианте настоящего изобретения предусматривается получение устойчиво трансформированных растений с помощью вышеуказанных молекул рзкомбинантной ДНК или химерного гена. Получрнное в результате тоангенное растение содержит трансфор-мировпнпнг ген устойчиво включённый в его геном, и экспрессирует структурный ген, оперативно связанный с промотором, соответствующим образом.

Трансгенные растения, рассматриваемые настоящим изобретением, включают как однодольные, так и вудольные растения. Представительными примерами таких растений являются кукуруза, люцерна, рис, картофель, подсолнечник /другие?/. В предпочтительные растения включена кукуруза, особенно инбредные линии кукурузы.

Все трансформированные растения, рассматриваемые настоящим изобретением, могут быть получены с помощью нескольких известных способов. A. tumefaciens-опосредствованная трансформация описана выше. Другие способы предусматривают прямой перенос гена в протопласты, Paszkowski et al., EMBO J., 12:2717 /1984/; Fromm et al., Nature 319:719 /1986/; бомбардировку микрочастицами, Klein et dl., Bio/Technology, 6:559-563 /1988/;инъекцию в протопласты, культивируемые клетки и ткани, Reich et al., Bio/Technology, 4:1001-1004 /1986/; или инъекцию в меристемати-ческие ткани или в проростки и саженцы, как это описано De La pc-na et al., Nature ,325:274-276 /1987/; Graves et al., Plant. Mol. Biol., 7:43-50 /1986/; Hooykaas-Van Slogteren et dl., Nature, 311:763-764 /1984/;- Grimsley et al., Bio/Technology, 6: 185 /1988/; и Grimsley et al., Nature,325:177 /1988/, а также электрофорез, патент wo92/09696/.

Паттерн экспрессии структурного гена, оперативно связанного с преимущественно-тканевым или специфически-тканевым промотором в трансформированном растении, содержащем то же самое, является критичным в случае, когда структурный ген кодирует инсектицидный белок. Например, паттерн экспрессии, являющейся преимущественно-сердцевинной, которая раскрыта в данном изобретении, позволяет трансгенному растению выдерживать и противостоять патогенам и травоядным, которые в первую очередь разъедают сердцевину, а также опорные корни, внешнюю оболочку и листья растения, поскольку белок Bt экспрессируется в меньшей степени, но все же в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми в этих частях растений, однако в случае наличия обоих типов промоторов семена растения остаются неповрежденными.

Примеры.

Следующие примеры описывают материалы и способы, используемые для реализации изобретения. Эти

примеры являются чисто иллюстративными и не ограничивают объем притязаний изобретения.

Пример 1: Общие способы.

Манипуляции, проводимые с ДНК, осуществлялись с использованием процедур, являющихся стандартными в данной области. Эти процедуры зачастую могут быть модифицированы и/или изменены без существенного отличия в полученном результате. Помимо случаев, на которые делаются ссылки из других источников, большинство указанных процедур описаны в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition, 1989. Синтез олигомеров ДНК:

Олигомеры ДНК, содержащие от приблизительно двадцати до приблизительно девяноста, преимущественно от приблизительно шестидесяти до приблизительно восьмидесяти, нуклеотидов, синтезируют с использованием синтезатора ДНК Applied Biosystems, модель PPOB, и стандартных процедур. Олигомеры получают, используя современный цикл SSCAF3 в малоразмерной /0,2мм/ крупнопористой колонке ABI. Конечной процедурой является удаление третилы и расщепление олигомера на колонке, используя автоматический цикл расщепления, предусмотренный на установке 380B. Затем олигомеры деблокируют в избытке гидроокиси аммония /NH₄OH/ при температуре 55°C в течение 8 - 12 часов. После этого олигомеры высушивают в выпарном аппарате с использованием азота. Затем олигомер ресуспендируют в 0,25 - 0,5мл деионизированной воды. Очистка олигомеров ДНК:

Аликвотную пробу каждого олигомера смешивают с равным объемом смеси синего красителя и формамида с получением Конечного ' раствора, содержащего 0,05% бромфенольной сини, 0,05% цианолкси-лола FP и 25% формамида. Указанную смесь нагревают при температуре 95°C в течение 10 минут с целью денатурирования олигомеров. Затем пробы наносят на полиакриламидмочевинный гель, содержащий 7М мочевины /Sambrook et al / . После электрофореза при напря-жении 300 - 400В в течение 3 - 4 часов, используя гелевую установку для вертикального электрофореза /Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA/, осуществляют ультрафиолетовое экранирование для локализации в геле фрагмента требуемого размера, который затем удаляют с помощью бритвы. Фрагмент очищенного геля измельчают и инкубируют в буферном растворе из 0,4 LiCl и 1мМ комплексона /EDTA/ /pH8/ в течение всей ночи при температуре 37°C.

Для отделения олигомеров от остатков полиакриломидного геля используют любой из двух способов: с применением полиэтиленовых фильтров с размером пор 25мм Gene/x или фильтров тонкой очистки с размером пор 0,45мм - мембранного фильтра MC. Очищенные олигомеры осаждают этанолом, восстанавливают с помощью центрифугирования на микрофуте в течение 20мин при температуре 4 °C и окончательно ресуспендируют в растворе TE /10мМ 1мМ EDTA, pH8,0/. Концентрацию доводили до величины, равной 50нг/мкл., основываясь на просматривании при длине волны 260ум.

Определение размера олигомеров путем мечення их киназой: Для определения размера некоторых олигомеров на секвени-рующем геле осуществляют реакции мечення киназой, используя очищенные синтетические олигомеры каждого представительного размера: 40 олигом., 60 олигом., 70 олигом., 80 олигом., 90 одкромеров. В каждой из указанных реакций в 20мкл использовали 1пмоль очищенного олигомера в буферном растворе, содержащем 7мМ Tris pH7,5, 10мМ KCl, 1мМ MgCl₂, 0,5мМ ДТТ /дитиотреитол/, 50мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 3000мкCl /3 пмоля/ 32P-гаммаАТР, и 8 единиц полинуклеотидной киназы T4. Пробу киназы инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C с последующей экстракцией фенол/хлороформа и трех этаноловыхпреципитаций с гликогеном в качестве носителя /Tracy, Prep. Blochem. 11:251-268 (1981).

Две гелевые загрузки / одну, содержащую 1000 ерт* (* ерт - импульсов в мин /прим, перев.), а другую, содержащую 2000 ерт/каждой реакции готовили вместе с 25% формамнда, 0,0С5% бромфеноловой сини и 0,05% цианолксиллола FF.

Олигомепы, маркионанныр киназами, кипятили в течение 5 минут перед загрузкой на секвенирующий гель, содержащий 6% полиакриламида и 7М мочевины /BRL Gel Mix TM6, BRL, Galthersburg, MD/. Реакция секвенирования плазмиды после проводится на том же геле с целью получения маркеров размеров.

После электрофореза гель высушивают и экспонируют на диагностическую рентгеновскую плёнку /Kodak, X-OMAT AB/. Полученный автордиографический снимок показывает, что все подлежащие проверке очищенные олигомеры имеют правильный размер. Олигоме-ры, которые не были измерены непосредственно на секвенирующем геле, исследовали на геле из 6% полиакриламида и 7М мочевины /BRL Gel mix тмб/, используя измеренные олигомеры в качестве маркеров размеров. Все олигомеры после загрузки на гель вначале денатурируют 25%формамидом при температуре 100°C в течение 5минут. Окрашивание геля полиакриламида этидиумбромидом позволяет визуально наблюдать все олигомеры с целью определения их размеров.

Гибридизация олигомеров для прямого клонирования:

Подлежащие гибридизации олигомеры объединяют /от.1мкг до 20мкг общей ДИК/и юровоцят. киназную реакцию .1час в их лигирующем буфере .Fromega , содержащем 30мМ Tris-HCl pH7,8, 10мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ и 1мМ dATP. В реакции в зависимости от количества присутствующей общей ДНК используют от 1 до 20 единиц полинуклеотидной киназы T4. Реакции маркирования киназой останавливают путём помещения пробы в ванну с кипящей водой на 5 минут. Олигомеры, образующие 5'-концы гибридизированных молекул, не метят киназами, а добавляют к меченым киназой олигомерам имеете с дополнительным буфером для гибридизации после нагрева. Объединенные олигомеры вместе с буфером для гибридизации, используемым с целью регулирования условий высаливания при конечном содержании 100мМ NaCl, 120мМ Tris pH7,5, и 10мМ MgCl₂, составляют по объёму 50 - 100мкл. Меченые и немеченые киназами олигомеры, нагревают в ванне с кипящей водой в течение 5минут и медленно охлаждают до комнатной температуры в течение приблизительно 4 часов. Затем гибридизированные олигомеры экстрагируют фенол/хлороформом, осаждают этанолом и

ресуспендируют в 17мкл TE /10мМ Tris, 1мМ EDTA, pH8,0/. Используя указанные 17мкл TE, образуют лигирующую пробу с конечным объёмом, равным 20мкл /конечные условия: 30мМ Tris-HCl, pH7,8, 10 мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ, 1мМ ATP и 3 единицы лигазы ДНК T4 /Pro-mega, Madison wll/. Лигирование при комнатной температуре в течение приблизительно двух часов. Гибридизированные и лигированные фрагменты обычно очищают на 2% Nusieve гелях перед и/или после разрезания рестрикционными ферментами /рестриктазами/ перед клонированием в векторы. Лигирующую пробу в объёме 20мкл получают, используя от 100 до 500нг каждого Фрагмента с приблизительно эквимольным количеством ДНК в буфере, содержащем 30мМ Tris-HCl, pH7,8, 10мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ 1мМ ATP и 3 единиц лигазы ДНК T4 /Promega, Madison, WI/. Лигирующую смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов. После лигирования ДНК трансформируют в замороженные надлежащие клетки E. coli, используя стандартные процедуры /Sambrook et al./, а трансформанты селектируют на LB-агаре /Sambrook et al/, содержащем 100мкг/мл ампицилина /см. ниже/.

Пробы PCR для скрининга клонов в E. coli:

Колонии E.coli, содержащие соответствующую вставку ДНК, идентифицируют с помощью PCR /см. Sandhu et al., BioTechniques 7:689-690 /1989//. С помощью зубочистки колонии соскребывают с пластины, задействованной в течение всей ночи, и добавляют к смеси пробы с объёмом от 20 до 45мкл, содержащей приблизительно 50 пмоль каждого гибридизирующего праймера /см., например, использование праймеров MK23A28 и MK25A28 для селекции ориентации фрагмента SacI в pHYB2 6/, от 200мг до 400мг каждого dNTP и 1х реакционный буфер /Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT/noM6 кипячения реакционной смеси E.coli /рек в водяной бане в течение 10 минут

5 МКЛ ПОЛИМЕРАЗЫ Taq /0,5 единиц/ /Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn./ добавляют в реакционный буфер IX. Параметры пробы PCR обычно выбирают такими, что этап денатурации при температуре 94°C длится в течение 30 с.гибридизации – при температуре 55°C в течение 45с. и удлинения-при температуре 72 °C в течение 45с., используя от 30 до 36 циклов. Продукты реакции PCR помещают на гели агарозы или Nusieveagarose /PMC/ для обнаружения амплифицированных фрагментов подходящего размера. Лигирование:

Фрагменты полученные путем переваривания рестриктазой, очищают в 1% LGT - /низкоплавкая агароза, FMC/, 2% Nusieve /FMC/ или в 0,75% агарозы, используя методики, стандартные для данной области исследований. Диски ДНК визуализируют этидиумбромидом, а диски восстанавливают из геля путём эксцизии с помощью лезвия. Фрагменты, выделенные из LGT, лигируют непосредственно BLGT. Десять микролитров каждого извлечённого фрагмента ДНК используют для сборки лигирующих проб, получая конечную лигирующую пробу и объём, равном приблизительно 23мкл. После эксцизии с помощью лезвия восстановленные диски геля,, содержащие требуемые Фрагменты ДНК, подвергают тепловой денатурации и вводят в буфер для лигазы IX, после чего добавляют 3 единицы лигазы ДНК T4 /Promega/, как это описано выше. Фрагменты, выделенные из обычной агарозы или Nusieve агарозы, очищают от агарозы, используя фильтры тонкой очистки с размером пор 0,45мкм /ультратонкий/ мембранный фильтр/, а затем лигируют, как описано выше. Лигирующие пробы инкубируют при комнатной температуре в течение двух часов перед трансформацией их в замороженные подходящие клетки E.coli, используя стандартные процедуры /Sambrook et al./.

Трансформации:

Замороженные подходящие клетки E.coli штамма ЛНВальфа или HB101 приготавливают и трансформируют, используя стандартные процедуры /Sambrook et al./ . Подходящие КЛЕТКИ E.coli "SURE"- получают из стратагема /La Jolla, CA/. При лигированиях, выполненных в агарозе LGT, после завершения реакций лигирования 50мМ CaCl₂ добавляют к конечному объёму, равному приблизительно 150мкл, и раствор нагревают при температуре, приблизительно равной 65°C в течение приблизительно 10минут до полного плавления агарозы. Затем раствор перемешивают и охлаждают на льду в течение 10минут перед добавлением 200мкл подходящих клеток, которые оттаивали на льду. Указанную смесь подвергают инкубированию на льду в течение 30минут. Последующий нагрев смеси осуществляют при температуре 42°C в течение 60секунд перед охлаждением на льду в течение двух минут. Далее добавляют 800мкл среды soc /20% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1 мМ NaCl, 2,5мМ KCl, отрегулированного до pH8 с 5 N /молярных долей/паон, 20мМ смеси MgCl₂:MgSO₄, и 20мМ глюкозы; Sambrook et al. / и клетки инкубируют при температуре 37°C с взбалтыванием в течение приблизительно одного часа перед зыеванием на чашки на селективные среды. Обычно селективная среда представляет собой L-арар /Sambrook et al./, содержащий 100мкг/мл ампицилина.

Если лигирование выполняли в растворе, не содержащем агарозу, обычно 200мкл замороженных подходящих.клеток в, coli /штамм ВНЗальфа /BRL, Gaithersburg, MD или клетки Sure,Stra-tagene, La Jolla, CA/ оттаивали на льду и добавляли 5мл лигирующей смеси. Пробу инкубировали на льду в течение 45...60мин, затем клетки вновь нагревали при температуре 42°C в течение приблизительно 90 секунд. После регенерации при комнатной температуре в течение приблизительно 10минут добавляли 800мкл среды SOC, после чего клетки инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C с взбалтыванием и высевали на чашка, как это описано выше.

При скринировании для вставок в ген бета-галактозидазы в некоторых стандартных используемых векторах 200мкл восстановленной трансформирующей смеси высевали на чашках с LB-агаровой средой, содержащей 0,008% X-гала, 80мкМ изопропилтиогалактозида /IPTG/ и 100мкг/мл ампицилина /Sambrook et al/. Для обеспечения селекции и роста трансформантов чашки инкубировали всю ночь при температуре 37°C.

Минискрининг ДНК:

На чашках с селективными средами выращивали трансформанты и исследовали и подтверждали их плазмидную структуру, используя стандартные методики минискринирования плазмид /Sambrook et al./.

Обычно для получения небольших количеств плазмидной ДНК для анализа используют методику "кипячения" /Sambrook et al./.

Ч некоторых других случаях используют методику с применением ацетат аммония. Указанная методика является модификацией методики, описанной ShIng-yl Lee et al., Bloteohnlques 9:676-679 /1990/.

1/ Инокулируют единичную бактериальную колонию из селективных чашек, которые были задействованы всю ночь, в 5мл /может быть уменьшено до 1мл/ среды TB (Sambrook et al.) и выращивают её в присутствии соответствующего антибиотика.

2/ Всю ночь инкубируют на вращающемся цилиндре при температуре 37°C.

3/ Собирают 5мл бактериальных клеток в пластиковую пробирку OakridgeH вращают в роторе типа Sorvall SS-34B течение 5минут при 5000 оборотов в минуту.и температуре 4°C.

4/ Удаляют надосадочную жидкость.

5/ Ресуспенсируют пелетту в 1мл лизисного буфера /50мМ глюкозы, 25мМ Trls-hci /pH8,0/, 10мМ EDTA и 5мг/мл лизоцима/, взбалтывают в течение 5 секунд и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут.

6/ Добавляют 2мл щелочного раствора /0,2N NaOH, 1% додецилсульфат натрия/, плотно закрывают крышкой, перемешивают, переворачивая пробирку 5 раз, и /помещают пробирку в ванну с ледяной водой на 5 минут.

7/ Добавляют 1,8ми охлажденного да температуры льда ацетата аммония /7,5М, pH7,6/, перемешивают путем пятикратного плавного переворачивания пробирки и помещения её в ванну с ледяной водой на время, равное 5 минутам.

8/ Центрифугируют смесь в течение 10 минут при комнатной температуре и скорости вращения, равной 9000об/мин.

9/ Переливают чистую надосадочную жидкость в пробирку Corex и добавляют 0,6 объемов изопробанола /приблизительно 2,5мл/. Дают отстояться при комнатной температуре в течение 10 минут.

10/ Центрифугируют смесь в течение 10 минут при комнатной температуре и скорости вращения, равной 9000 об/мин, и удаляют надосадочную жидкость.

11/ Ресуспенсируют палетту в 300мкл буфера TE. Добавляют 6мкл исходной РНКазы А и TI [приготовленной в виде раствора объемом 200мкл путем добавления 180 РНКазы А (3254 единиц/ мг белка, 5,6мг белка/мл и 20мкл РНКазы TI [481 единица/мг белка, 1,2мг белка/мл]. Указанные компоненты могут быть закуплены У USB/US Blochemical/ . Помещают В микроцентрифужную пробирку и инкубируют при температуре.370с в течение 15 минут.

12/ Добавляют 75мкл дистиллированной воды и 100мкл ацетата аммония /7,5М/ и инкубируют в ванне с ледяной водой в течение 10минут.

13/ В микрофуге Бекмана при 7400 об/мин центрифугируют смесь в течение 10минут при температуре 4°C.

14/ Осаждают путем добавления 2,5 объемов 100%EtOH /приблизительно 1мл/ и инкубируют в ванне с ледяной водой в течение 10 минут.

15/ Центрифугируют в микрофуге при 14000об/мин в течение 10минут.

16/ Промывают пелетту 70% этанолом /используя 0,5 - 1мл/. Высушивают пелетту и ресуспенсируют её в 100мкл Ix оуфера 4 рестриктазы New England Biolabs [20мМ Trls-HCl/pH 7,9/, 10мМ ацетата магния, 50мМ ацетата калия, 1мМ ДДТ]. Измеряют концентрацию и проверяют чистоту с помощью спектрофотомет-рии при спектральной поглотательной способности на длинах волн 260 и 280нм.

Для более быстрого определения того, вместила ли данная бактериальная колония рекомбинантную плазмиду, применяют методику минискрининга PCR, используя модификацию методики, описанной /Sandhu,- G.S. et ed., 1989, Blotechnlques, 7:689-690/. Другими словами, готовят следующую смесь:

100мкл вышеупомянутой смеси праймера, по 20мкМ каждого прармера;

100мкл смеси RNTP /2,5мМ каждого/;

100мкл 10x буфера Amplltaq /Ferlin-Elmer-Calus, Ix буфер = 10мМ Trls-HCl pH8,3, 50мМ KCl, 1,5мМ MgCl₂ и 0,01% желатина/;

700мкл деионизированной воды.

20мкл вышеуказанной смеси помещают в полипропиленовую пробирку емкостью 0,5мл для PCR. Трансформированную бактериальную колонию соскребают зубочисткой и ресуспендируют в смеси. Пробирку кладут в водяную баню на 10минут, а затем охлаждают до комнатной температуры перед добавлением 5мкл нижеуказанной смеси: 265мкл деионизированной воды 30мкл буфера Amplltaq /Perkin-Elmer Ceip,буферIX = 10мМ Tris-HCl pH8,3, 50мМ KCl, 1,5мМ MgCl₂ и 0,01% желатина/

7,5мкл полимеразы Taq

Образцы покрывают 50мкл минерального масла и выполняют 30 циклон PCR, соблюдая следующие параметры:

денатурация: 94°C в течение 1мин

гибридизация: 55°C в течение 1мин

удлинение: 72°C в течение 45с.

После амплификации PCR добавляют 1мкл загрузочного красителя /30% глицерина, 0,25% бромфенольной сини, 0,25% цианолсилола/, после чего 20мкл смеси загружают на 2% Nusleve, 1%агарозный гель для визуального определения того, имеет ли продукт PCR, ожидаемый размер.

Указанная процедура используется в качестве первоначального скрининга. Затем с целью подтверждения структуры плазмид её вставки до секвенирования осуществляют её перенос.

Пример 2: Амплификация и сборка каждой четверти.

Клонирование фрагментов синтетического гена.

Синтетический ген был сконструирован таким образом, чтобы его можно было клонировать в четыре части, каждая из которых приблизительно составляет одну четвертую часть гена. Олигомеры для каждой четверти группировали с целью сборки в структуру с помощью FCR, гибридизации или комбинации гибридизации с последующей амплификацией PCR, как это описано в другом месте. Синтетические четверти собирали вместе путем наложения рестрикционных сайтов Aat II, .NcoI, и Apa I между первой и второй, второй и третьей и третьей и четвертой четвертями соответственно.

Каждая четверть гена / размер которой приблизительно составляет 500bp/ собирали путём гибридизации соответствующих олигомеров и амплификации желательного фрагмента, используя праймеры PCR, характерные для концов этой четверти. Использовались два различных набора проб PCR с применением двух наборов незначительно отличающихся друг от друга праймеров. Продукты PCR указанных двух проб конструировали таким образом, чтобы они были идентичны, за исключением того, что в первой пробе на 5'-конце кодирующего участка имелась дополнительная последовательность AATT, а во второй пробе на 3'-конце данной четверти имелась последовательность AECT. Когда продукты указанных двух проб определенной четверти смешивали /после удаления полимераз, праймеров и незавершенных продуктов/, денатурировали и затем ренатурировали, определенное количество /теоретически 50%/ отожденного продукта должно было иметь негомолочные избыточные концы.

Эти концы были сконструированы таким образом, чтобы соответствовать "липким концам", образованными во время рестрикционного переваривания EcoRI на 5'-конце и Hind III на 3'-конце молекулы. Полученные в результате молекулы были фосфорилированы, лигированы в перепаренный EcoRI/HincII и фосфатированный блюскрипт-вектор и трансформированы в замороженный подходящий E.coli штамм. DH5alpha. После селекции колонии E. coli, содержащие необходимый фрагмент, идентифицируются с помощью г паттернов рестрикции ДНК. Затем вставки, представляющие части синтетического гена, очищают и секвенируют, используя стандартные методики. Во всех случаях, клоны из многих проб PCR генерируются и секвенируются. Затем четверти соединяют имеете, используя специфические рестрикционные сайты в местах соединения для получения полного гена.

Клонированные четверти идентифицируются с помощью методик мини-скрининга и секвенирования фрагмента, гена. Находят, что в последовательность часто вводят ошибки, с наибольшей вероятностью на этапе амплификации PCR. Для коррекции таких ошибок в клонах, которые содержат только несколько таких ошибок, используют гибридные олигомеры. Гибридные фрагменты перевариваются в местах узнавания рестриктазы внутри фрагмента и клонируются для замещения мутированного участка синтетического гена; Длина гибридных фрагментов колеблется от 90bp /например, участок, который замещает фрагмент между сайтами Sac II во 2-ой четверти/ до приблизительно 350bp у Фрагмента 4-ой четверти, который замещает две индуцированные мутации PCR в 4-ой четверти гена.

Из-за высокого коэффициента ошибок PCR плазмиды конструируются таким образом, чтобы обеспечить селекцию фрагмента клонированного гена, содержащего открытую считывающую рамку. Указанная плаزمиды конструируются так, что, если открытая считывающая рамка вводится в клонирующие сайты, трансформированные бактерии могут расти в присутствии канамицина. Конструкция указанного вектора детально описана ниже. Такая система селектирования в значительной мере способствует прогрессу, позволяя быстро идентифицировать клоны открытыми считывающими рамками без необходимости секвенирования большого числа независимых клонов.

Синтетические четверти собирают в различные плазмиды, включая BSSK/Стратеген; La Jolla, Ca/, Puc18 /Sambrook et al/, и Кмэкспрессирующий вектор. В данной области известны и могут быть использованы другие подходящие плазмиды, включая плазмиды на основе фиг. Полное секвенирование клонированных фрагментов, анализ метрдом вестерн-блотирования продуктов клонированного гена и биопробы насекомых, используя в качестве подопытного насекомого Европейский зерновой точильщик, свидетельствуют, что были получены полностью функциональные синтетические гены cryIA(b) Bt.

Конструкция Км-экспрессирующего вектора для селекции открытых считывающих рамок:

Км-экспрессирующий вектор конструируется с целью селектирования фрагментов синтетического гена, содержащего открытые считывающие рамки. Олигомеры PCR конструируются с целью обеспечения слияния гена NPTII из Tп5, начиная от нуклеотида 13 /Reisg et al., EMBO J. 3:3317-3322 1984 /, с pUC18 и введения полезных рестрикционных сайтов между сегментами ДНК. Полилинкерный участок содержит рестрикционные сайты, обеспечивающие клонирование различных синтетических фрагментов Bt IP в рамке генетического кода геном Км /канамицина/. 5 олигомер длиной 88bp, содержащий полилинкерный участок, очищают на 6% полиакриламидном геле, как это описано выше относительно очистки олигомера PAGE. "Пробу PCR собирают с фрагментом кодирующей нити ДНК Bgl 11/Sma I, который содержит ген NPT II, выделенный из Tп5. Смесь пробы PCR содержит 100нг кодирующей нити ДНК вместе со 100 пмоль олиго-меров KE72A28. и KE74A28 /см. нижеприведенные последовательности/, 200нМ dNTP, и 2,5 единицы полимеразы Taq с общим объемом 50мкл при равном объеме покрывающего смесь минерального масла. KE74A28

5'- GCAGATCTGG ATCCATGCAC GCCGTGAAGG CCCCTTCTAG AAGGCCTATC GATAAAGAGC TCCCCGCGGA TGGATTGCAC GCAGGTTTC-3'

K372A28

5'- GCGTTAACAT-GTCGACTCAG AAGAACTCGT CAAGAAGGCG-3'

Используемыми в методике параметрами PCR являются: 94°C в течение 45 секунд, 55 °C в течение 45 с и 72°C в течение 55с, удлинение третьего этапа на 3с в течение 20 циклов. Все пробы PCR выполняют в датчике

термоциклов Perkin-Elmer Cetus. Продукт, амплифицированный PCR, имеет размер, равный 800bp, и содержит полилинкерный участок с трансляционным иницирующим сайтом, за которым следуют специфические рестрикционные сайты, слитые в рамке генетического кода с Км геном из основания №13, входящего в состав трансляционной последовательности нуклеотидов, терминирующей транскрипцию, рис :KM74 представляет собой Км-эксп-рессирующую кассету, которую собирают из Bgl II/Sal I полилинкер/Км фрагмента с размером 800bp, клонированного в вектор pUC18. lacZ промотор позволяет экспрессировать Км ген в E.coli. Производные pUC:KM74 сначала необходимо высевать на чашки с LB-агаром, содержащие 100мкг/мл ампицилина для селекции трансформантов, которые затем могут быть скринированы на чашках с LB-агаром, содержащих 25мкг/мл канамицина/IPTG. Фрагменты синтетического гена Bt IP собирают из каждой четверти в Км-кассету с целью контроля клонирования открытой считывающей рамки, содержащей части фрагментов. Первый фрагмент синтетического гена Bt IP, эффективного относительно ECB, pBi:Km№6, представляет собой ген, показывающий устойчивость к канамицину. Затем указанный фрагмент исследуют на содержание мутаций в третьей и четвертой четвертях, которые позже репарировать.

Пример 2А: Синтез и клонирование первой четверти синтетического гена/ 1 - 550пар, комплементарных оснований/

С целью клонирования 1-ой четверти последовательности, синтетической ДНК, кодирующей синтетический ген Bt cryIA(b), проводят следующие операции. Те же операции проводят; по существу, для синтеза и клонирования других четвертей, за исключением указанных для праймеров и рестрикционных сайтов.

Матрица для четверти 1: смесь равных количеств очищенных олигомеров U1-U7 и L1 - L7

Праймеры PCR:

Прямые:

P1 /a/: 5'- GTCGACAAGG ATCCAACAAT GG-3'

P1 /b/: 5'- AATTGTCGAC AAGGATCCAA CAATCG-3'

Обратные:

P2 /a/: 5'- ACACGCTGAC CTCGCGCAGC ACG-3'

P2 /b/: 5'- AGCTACACGC TGACGTCCGG CAG-3'

Пара праймеров A1: P1/b / + P2 /a/

Пара праймеров A2: P1/a/ + P2 /b/

Пробу PCR, содержащую олигомеры, имеющие первую четверть синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена Bt IP, формируют следующим образом:

200-нг олигосмеси /все олиго для данной четверти, смешанные в равных по весу количествах/

10мкл праймерной смеси /смесь 1 : 1 каждого праймера по 20мкМ; праймеры описаны выше/

5мкл буфера 10X PCR

Используемый буфер PCR может представлять собой либо

/a/ концентрацию IX, содержащую 10мМ KCl, 10мМ /NH₄/2SO₄, 20мМ Tris-HCl, pH8,0, 2мМ Mgso, и 0,1% TritonX-100/, или

/b/ концентрация IX, содержащая 10мМ Tris-HCl pH8,3, 50мМ KCl, 1,5мМ MgCl₂, 0,01% в отношении веса к объему желатина.

Компоненты смешивают, нагревают в ванне с кипящей водой в течение 5 минут и инкубируют при температуре 65°C в течение 10 минут.

Затем добавляют следующие реагенты:

8мкл смеси dNTP /конечная концентрация в смеси составляет 0,2мМ каждой составляющей/

5 единиц полимеразы.

Конечный объем реакционной смеси; составляет 50мкл.

Затем олигомеры инкубируют в течение 3 минут -при температуре 72°C и после этого проводят цикл PCR.

Реакцию PCR проводят в датчике термоциклов со следующими циклами:

цикл денатурации: 94°C в течение 1 минуты

цикл гибридизации: 60°C в течение одной минуты

цикл удлинения: 72°C в течение 45 секунд /плюс 3 секунды на каждый последующий цикл/

количество циклов: 15

После завершения реакции 10мкл пробы ПСК загружают на 2% Nusleve-GTG /FMC/, 1% агарозный аналитический гель с целью управления реакцией. Оставшиеся 40мкл используют для клонирования Фрагментов гена, как это описано ниже.

Продукты PCR

Концы двуцепочечного продукта PCR, соответствующие различным праймерным парам, показаны ниже /только верхняя нить/: A1 AATTGTCGAC_____GCGTGT /554bp/ первая четверть. A2 GTCGAC_____GCGTGTACCT /554bp / первая четверть.

Гибридизация

40мкл каждой пробы PCR описанной выше, очищают, используя колонку chromaspin 400 /Clontech, Palo Alto,CA/ в соответствии с заводскими инструкциями. Перед загрузкой в колонку к пробам добавляют 5мг ДНК-носителя. / Это делают для большинства случаев клонирования. Однако в некоторых случаях для удаления полимеразы Taq осуществляют фенол: хлороформовую вытяжку проб PCR, используя стандартные методики /Sambrook et al./и ДНК, созданную при ПОК, восстанавливают из водной фазы, используя стандартную методику осаждения этанолом. ДНК-носитель не вымывается с сформированными Фрагментами PCR.

Дубликаты проб A1 и A2 каждой четверти смешивают и нагревают в ванне с кипящей водой в течение 10 минут,

а затем всю ночь инкубируют при температуре 65°C. После этого пробы удаляют из ванны с температурой воды, 65°C и осаждают этанолом с 1мкл /20мкг/ гликогена, свободного от нуклеазы /Trasy, Prep. Blochem.II:251-268 /1981/ в качестве носителя. Пеллету ресуспенсируют в 40мкл деионизированной воды.

5 Реакция фосфорилирования

Реакцию фосфорилирования осуществляют следующим образом:

40мкл ДНК

2,5мкл, 20мМ АТФ

0,5мкл 10X BSA/DTT /IX = 5мМ DTT, 0,5мг/мл BSA/

10 1,0мкл 10X полинуклеотидный киназный буфер /1х = 70мМ Tris.HCl, pH7,6, 0,1М KCl, 10мМ MgCl₂/

2,0мкл полинуклеотид киназы /New England Biolabs, 20 единиц/.

Инкубацию осуществляют в течение 2 часов при температуре 37°C.

Затем пробу экстрагируют один раз смесью фенол : хлороформ в соотношении 1 : 1, после чего экстрагируют хлороформом и осаждают водную фазу этанолом, используя стандартные методики. Пеллету ресуспенсируют в 10мкл TE.

15 Обработка рестриктазами

20мкг блюскрипт-вектора /BSSK+, stratagene, La Jolla, CA/ 10мкл 10 х рестрикционного буфера /IX = 20 мРЛ Tris-HCl, pH8,0, 10мМ MgCl₂, 100мМ NaCl/

5мкг Eco RI /New England Biolabs/, 100 единиц

20 5мкг HInd III /New England Biolabs/, 100 единиц

Конечный объем пробы составляет 100мкл.

Инкубирование осуществляют в течение 3 часов при температуре 37°C.

После завершения реакции пробу экстрагируют равным объемом фенола, насыщенным TE /10мМ Tris-HCl, pH8,0 и 10мМ EDTA/. После центрифугирования водную фазу экстрагировали равным объемом смеси /насыщенного TE/ фенолхлороформа в соотношении 1 : 1 /"хлороформ" представляет собой смесь хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24 : 1/, после чего водную фазу этой экстракции экстрагировали равным объемом хлороформа. Конечную водную фазу осаждали этанолом / за счёт добавления 10мкл 3М уксуснокислого натрия и 250мкл абсолютного этанола/, выдерживали в течение 10 минут при температуре 4°C и центрифугировали в микрофуге при максимальной скорости вращения в течение 10 минут.

30 Пеллету прополаскивали в 70% этаноле и высушивали при комнатной температуре в течение 5 - 10 минут и ресуспенсируют в 100мкл 10мМ Tris.HCl /pH8,3/.

Фосфатазная реакция

Для уменьшения количества колоний, полученных без вставки, вектор ДНК обычно обрабатывают фосфотазой. Обычно используют щелочную фосфотазу из кишечника телёнка /sambrook et al/, но для данного

35 этапа могут быть также использованы другие фосфатазные ферменты.

Типовые фосфатазные реакции приведены ниже:

90мкл вышеописанной гидролизованной ДНК

10мкл 10х буфера щелочной фосфатазы из кишечника теленка /1х = 50мМ Tris-HCl /pH8,3/, 10мМ MgCl₂, 1мМ ZnCl₂, 10мМ спермидина/

40 1мкл /1 единица/ щелочной фосфатазы из кишечника теленка/ CIP, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN/.

Инкубирование проводили в течение 1 часа при температуре 37°C.

Затем ДНК очищают на геле /1% с низкой температурой зас-тудневания /LGT/ гель агарозы/, и пеллету ресуспенсируют в 50мкл TE. После электрофореза соответствующий диск эксцизируют из геля с помощью лезвия, плавят в течение 5 минут при температуре 65°C и разбавляют TE в соотношении 1 : 1. Указанный

45 раствор дважды экстрагируют фенолом, один раз вышеупомянутой смесью фенола и хлороформа и один раз хлороформом. Конечную водную фазу осаждают этанолом и ресуспенсируют в буфере TE.

Лигирование:

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

5мкл фосфорилированной вставки ДНК

50 2мкл фосфатазного блюскрипт-вектора, обработанного Eco RI/HInd III, нагреваемого при температуре 65°C в течение 5 минут, а затем охлаждённого

1мкл 10X лигазный буфер /IX буфер= 30мМ Tris. HCl /pH7,8/, 10мМ, MgCl₂, 10мМ DDT, 1мМ АТФ/

1мкл BSA /1мг/мл/

1мкл лигазы /3 единицы, Promega, Madison, Wisc./

55 Обычно пробы лигазы инкубируют всю ночь при температуре 16°C или при комнатной температуре в течение двух часов.

Трансформация

Трансформацию Фрагментов лигированной ДНК в E. coli выполняют, используя стандартные методики /sambrook et al./, как это описано выше.

60 Идентификация рекомбинантов

Белые или светлоголубые колонии, полученные в результате ночной инкубации трансформирующих чашек, селективируют. Плазмиды в трансформантах характеризуют, используя стандартные методм минискрининга /Sambrook et al/ или так, как это описано выше. Обычно используют одну из трёх методик, перечисленных ниже:

/1/ Метод приготовления минипрепарата ДНК нагреванием

65 /2/ PCR минискрин

/3/ микроколичества аммоний ацетата

Перевар рестриктазами рекомбинантных плазмид, как полагают, содержит первую четверть и составляется следующим образом

/а/переваривание Bат HI/AatII; 10мкл ДНК + 10мкл 1х рестриктазного буфера 4 New England Biolabs

0,5мкл Bam HI /10 единиц/

0,5мкл Aat II /5 единиц/

Инкубирование осуществляют в течение приблизительно 2 часов при температуре 37°C.

Клоны, идентифицируемые как имеющие необходимую рестрикции-онную структуру, затем подвергают перевариванию-спомощью Pvu II и Bgl II в отдельных пробах. В дальнейшем для секвенирования берут только клоны с требуемыми паттернами рестрикции, переваренные всеми тремя энзимами.

Секвенирование фрагментов клонированного гена:

Секвенирование осуществляется, используя модификацию дидезоксиметода Сэнгера обрыва цепи /Sambrook et al./, применяя двуцепочечную ДНК из набора Секвенасы 2 /United States Biochemical Corp., Cleveland, OH/. Всего секвенируется шесть клонов первой четверти. Считают, что из всех секвенированных клонов только два клон, обозначенных pQA5 и pQA1 содержат только одну делецию /каждый/. Указанные делеции состоят из одной комплементарной пары, каждая из которых расположена на позиции 452 в pQA1 и на позиции 207 в pQA5.

Для получения первой четверти с ожидаемой последовательностью используют плазмиду pOA1 с pP1-8 /как описано ниже/.

Пример 2B: Синтез и клонирование второй четверти.

/комплментарные пары оснрваний 531-1050/

Матрица: олигомеры U8-U14 и L8-L14

Праймеры PCR:

Прямые:

P3 /а/: 5'-GCTGCGCGAC GTCAGCGTGT TCGG-3'

P3 /в/: 5'-AATTGCTCGG CGACCTGAGC CTG

Обратные:

P4 /а/ : 5'-GGCGTTGCCC ATGGTGCCGT ACAGG-3'

P4 /в/ :- 5'-AGCTGGCGT TGCCCATGGT' GCCG-3'

Праймерная пара B1: P3/в/ + P4/а/

Праймерная пара B2: P3/а/ + P4/в/

Продукты PCR

B1 AATTGCTGCC _____ AACGCC /524 bp/вторая четверть B2 GCTCCG _____ AACGCCAGCT /524 bp/

Гибридизацию, амплификацию PCR, фракционирование по размерам на центрифугирующей колонке и клонирование фрагмента этого гена в блюскрипте, переваренном Eco RI/Hind III готовят, как описано выше для первой четверти /пример 2A/. Продукт PCR для первой четверти имеет размер, приблизительно равный 529 Бр, представляя вторую четверть гена / нуклеотиды 531-1050/. Трансформацию осуществляют в замороженные подходящие клетки E. Coli/ДН5альфа/, используя стандартные методики, описанные выше /Sambrook et al./.

Минискрининг клонов PQ3:

Минипрепарат ДНК готовят, как описано выше, и переваривают /а/ Aat II/Nco I, /в/Pvu II и /с/ Bgl I для подтверждения структурной вставки в вектор перед секвенированием.

Секвенирование выполняют, как описано выше, используя дидезоксиметод Сэнгера /Sambrook et al./.

Секвенируют всего тринадцать клонов этой четверти. Вторая четверть постоянно содержит одну или более делеций между позициями 884 и 887. В большинстве случаев G на позиции 884 делетирован. Плазида pQB5 имела только одну делецию на позиции: 884. Этот участок находится между двумя сайтами Sac II /позиции 859 и 949/. Коррекция этой делеций описана в примере 3.

Клоны первой половины /1 - 1050bp /.

Фрагмент для клонирования первой половины /четверти 1 и 2/ синтетического кукурузного гена Bt в качестве одного фрагмента ДНК получают рестрикционным перевариванием продукта пробы PCR, содержащей первую четверть и вторую четверть. Для разрыва двойной спирали ДНК в 20мкл пробе /после экстракции фенолом и преципитации этанолом/ используют рестриктазу Aat II. 15мкл каждой из переваренных четвертей Aat II смешивают и лигируют /в 50мкл объеме путем добавления 5мкл 10х лигазного буфера /1X = 30мМ Tris-HCl pH7,8, 10мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ, 1мМ ATP/ 14мкл деионизированной воды и 1мкл ДНК-лигазы фага T4, 3 единицы, Promega, Madison, WI/ при комнатной температуре в течение 2 часов. В результате получают фрагмент длиной, приблизительно равной 1kb, судя по данным электрофореза на геле 1% агарозы при использовании стандартных условий /Sambrook et al./.

Десять микролитров продукта лигирования амплифицировали с помощью PCR\ используя условия, описанные ранее, за исключением того, что выполняли только 5 циклов.

Праймерная пара: HA = P1 /а/ + P4 /в/

Праймерная пара: HB = P1 /а/ + P4 /а/

Продукт этих реакций клонировали в блюскрипт /Stratagene, La Jolla CA/, как это описано для индивидуальных четвертей. Указанную процедуру выполняли только один раз, т.е. все вставочные ДНК получали в данной области из единичной пробы PCR.

Тридцать шесть колоний минискринируют переварами Sal I и переварами Pvu II. Все колонии, за исключением четырех, содержат вставку с длиной, равной приблизительно 1kb, при этом по меньшей мере 20 колоний содержат правильную картину рестрикции. Pvu II. Восемь из этих клонов выбрали для анализа

последовательности. Один из клонов, PI-8, имел желательную последовательность между сайтом EcoNI/39fbp/ и сайтом DraII /640bp/. Этот клон использовали для получения плазмиды с желательной последовательностью, расположенной до сайта DraII /640bp/ во второй четверти с pQA /первая четверть с делецией Р на позиции 452 описана ранее/.

Пример 2С: Клонирование и синтез третьей четверти /комплементарные пары 1021-1500/

Матрица: Олиго UI5-U20 и LI5-L21

Праймеры PCR:

прямые:

P5 /a/: 5'-TTCCCCCTGT ACGGCACCAT GGGCAACGCC GC-3'

P5 /в/: 5'-AATTGTACCG GACCATGGGG AAC-3'

обратные:

P6/a/: 5'-GAAGCCGGGG CCCTTCACCA CGCTGG-3'

P6 /в/: 5'-AGCTGAAGCC GGGGCCCTTC ACC-3'

Праймерная пара C1: P5/в/ + P6/a/

Праймерная пара C2: P5/a/ + P6/в/

Продукт PCR:

C1 AATTGTACGG _____ GCCTTC /475bp /, 3 четверть

C2 TTCCCCCTGTACGG _____ GGCTTCAGCT /484bp 3 четв.

Реакции PCR, центробежное выделение фрагментов ДНК правильного размера и лигирование в векторы выполняются так, как это описано выше /Пример 2А/, используя разрезание блюскипт-вектора EcoRI и Hind III. Третья четверть синтетического гена /NT 1021-1500/ представляют приблизительно 479 комплементарных пар продукта PCR.

Трансформация в замороженные подходящие клетки ДН5альфа штамма E. coli, селекция и идентификация трансформантов, определение характеристик трансформантов с помощью минискрининга и секвенирование фрагмента синтетического гена в вектор описаны выше. - Минискрининг клонов РОС:

Третью четверть минискринируют, используя стандартные методики /Sambrook et al./ . Минипробу ДНК разрезают /a/ Nco I /Ara I и /в/ Pvu II. Клоны, содержащие правильные структуры рестрикционных гидролизатов, секвенируют, используя стандартные методики. Всего секвенировали 22 клон. В третьей четверти идентифицируют три основные "горячие пятна" делеций /a/ на позиции 1083, /в/ между позициями 1290-1397 и /с/ между позициями 1356-1362. Во всех клон, за исключением одного, pQC8, также постоянно имеется вставка С на позицию 1365. Кроме этих мутаций клоны третьей четверти содержат большое число других, по-видимому, случайных делеций. Общим фактором, определяющим наличие трёх мутационных "горячих пятен" в третьей четверти и одного "пятна" во второй четверти является то, что эти участки фланкировали на любой стороне последовательностями, содержащими приблизительно 80% С + G. Олигомеры на участках UI5, UI6, UI8, UI9, LI5, LI6, LI8, LI9 реконструировали с целью уменьшения содержания G + G на этих участках. Пять клонов из пробы PCR секвенировали, используя модифицированные олигомеры.

Плазмида pQCNIO3 имеет правильную последовательность для третьей четверти, за исключением изменения на позиции 1326. Это изменение, касающееся замещения С на С, приводит к замещению одной аминокислоты /лейцин/ на исходную /фенилаланин/.

Пример 2Д: Синтез и клонирование четвертой четверти /комплементарные пары 1480-1960/

Четвёртую четверть клон получали из клон, который первоначально был сконструирован с целью включения в себя третьей и четвёртой четвертей гена. "Вторую половину" синтетического гена получали из проб PCR с целью слияния третьей и четвертой четвертей. Указанные пробы использовали с праймерами PCR P5/a/ и P6/a/, описанными выше для третьей четверти, и с праймерами P7/a/ и P8/a/, описанными ниже. Обратный праймер модифицировали с целью включения сайта Sac I и терминирующего кодона. Отдельные пробы для каждой четверти исследовали в 30 циклах при условиях, описанных выше. Две четверти соединяли вместе путём перекрытия PCRn последующего переваривания рестриктазами NcoI и SaeI. Полученный фрагмент с размером 953bp клонировали непосредственно в pC1B3C54, который разрезали Nco I /Sac I и обрабатывали щелочной фосфатазой.

pC1B3054 конструировали путём вставки интрона № 9 РЕРкарбоксилазы /РЕРС интрон №9/ в специфический сайт Hra I pC1B246 /детально описанный в примере 4/. pC1B246 разрезали HraI и фосфатировали CIP, используя стандартные методики, описанные в примере 2А. РЕРС интрон №9 получали с помощью PCR, используя pРЕР-10 в качестве матрицы. pРЕР-10 является геномным субклоном, содержащим полный кукурузный ген РЕР карбоксилазы, кодирующий фотосинтетический фермент Сд, плюс 5'-фланкирующая часть ЛПК с размером приблизительно 2,2 kb и 3'-фланкирующая часть ДНК с размером 1,8Kb. ДНК с размером 10kb лигировали в HindIII сайте pUCIS + (Hudspeth et al., Plant Molecular Biology, 12:576-589 /1989/. Прямой праймер для PCR, используемый для получения РЕРСинтрона №9, представляет собой GTACAAAAACCAGCAACTC, а обратный праймер представляет собой CTGCACAAAGTGGAGTAGT.

Продукт РЦЦ является фрагментом с размером 108bp, содержащим только последовательности интрона №9 РЕРкарбоксилазы. Пробу PCR, экстрагировали фенолом и хлороформом, этанольный осадок фосфорилировали полинуклеотидной киназой и обрабатывали полимеразой Т4 с целью заполнения бретпи, обнаруженной в продуктах реакции PCR/Clark, J.M., Nucleic Acid Research, 16: 9677-9686 /1988/, используя стандартные методики. Меченый киназой фрагмент клонируют на тупом конце в HraI сайт pC13246, используя стандартные методики, описанные ранее.

Амплификация и сборка четвёртой четверти

Матрица: U21-U26 и L22-L28

Прагмеры PCR

Прямые

P7 /a/: 5'- TGGTGAAGGG CCCC GGCTTC ACCGG-3'

Обратные

P8 /a/: 5'- ATCATCGATG AGCTGCTACA CCTGATCGAT GTGGTA-3'

Праймерная пара 4: P7/a/ + P8/a/

Праймерная пара 3: P5/a/ + P6/a/

Граймерная пара для перекрытия PCR: P7/a/ + P8/a/

Продукт PCR,

четвёртая четверть: GGTGAA_____ATCAGGAGCTCATCGATGAT

/484bp/, третья четверть: TTCCCCCTGTA_____TTCACCGG

/484bp/, вторая половина: GGTGAA_____CATGATGAT /953bp/

Четыре положительных клон идентифицировали путём минискрининга плазмиды, а затем секвенировали, используя стандартные методики.

Плаزمида Bt.P2 №1 содержит приблизительно правильную последовательность четвёртой четверти, за исключением двух мутаций. Указанные мутации расположены на позиции 1523 / замещение A на C, в результате чего происходит изменение аминокислоты из-за замещения His на Arg/ и на позиции 1634 /замещающая T на C, в результате чего в аминокислоте происходит замещение Ser на Thr /.

Плазмиду Bt.P2 №1 использовали в конструкции pC1B4414, описанной ниже. /В итоге, ошибки исправляли путём гибридизации всех олиго четвертой четверти, обработки Aра 1/BstE II и замены этой области в pC1B4414. Поэтому в конечной конструкции оставались только последовательности от позиций 1842-1960 Bt.P2№1/.

Пример 3: Сборка и репарация конечного синтетического гена.

Синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген cryIA(b) Bt был сконструирован с целью клонирования в четверти. Использование методики PCR приводит, однако, к мутациям, которые в большинстве случаев представляют собой делеции, обуславливающие мутации со сдвигом рамки генетического кода. Поэтому плазмиды, содержащие индивидуальные четверти, секвенировали и правильные части лигировали вместе, используя стандартные методики.

После получения клонов паузой и второй четвертей с почти требуемой последовательностью конструировали плазмиды rEBIQ№4 и rEBIQ№5 с целью получения требуемой последовательности синтетического гена Bt до сайта DraIII на позиции комплементарной пары 634 /эта мутация разрушает сайт DraIII/. Конструкции rEBIQ изготавливали путём лигирования фрагмента Eco NI/BamHI с размером 3,9Kb из pP1-8 с фрагментом размером 400bp из rQAI. Плаزمида rEBIQ№5 имела требуемую последовательность до сайта DraIII, а плазмиды rEBIQ№4 имела мутацию на позиции комплементарной пары 378.

Плазмиды rHIM4 и rHIM5 конструировали с целью репарации сайта DraIII в плазмидах rEBIQ№4 и rEBIQ№5. Плазмиды rHIM№4 и №5 изготавливали путём лигирования фрагмента Nco I/Aat II с размером 3,5Kb из плазмид rEBIQM и №5 соответственно с фрагментом Nco I/Aat II с размером 500bp из rQB5. Плазмиды rHIM5 содержала мутацию между сайтами Sac II на позиции 884 во второй четверти синтетического гена Bt. Плазмиды rHIM4 содержала добавочную мутацию, как это описано для конструкции её предшественницы rEBIQ№4.

Сайт Sac II на участке блюскрипт-вектора rHIM4 делетировали путём разрезания rHIM4 Moi I и Sac I и конвертирования этих сайтов к тупым концам, используя полимеразу ДИК Т4 при стандартных условиях перед лигированием этого Фрагмента с размером 3,9Kb для получения rHIM4 S. Удаление сайта Sac II на участке вектора позн^оляет удалить фрагмент Sac II с размером 90bp с мутацией на позиции 884 во второй четверти rHIM4 перед замещением фрагмента Sac II с размером 90bp. Олигомеры U/L 12 и 13 метили киназой и гибридизовали /как это описано выше/ перед разрезанием Sac II и выделением Фрагмента с размером 90 bp на 2% Nusieve гель. Фрагмент Sac II лигировали с фрагментом, вырезанным из вектора rHIM4^S и обработанные Sac II с размером 3,8Kb, после чего указанный вектор фосфатизировали CIP. Конструкцию репарированного Sac II называют rHUB2№6. Ориентацию фрагмента Sac II в rHUB2№6 определяли путём скрининга PCR, как это описано ранее, используя следующие праймеры:

MK23A28 = 5'-GGGGCTGCGGATGCTGCCCT-3'

MK25A28 = 5'-GAGCT5ACCCTGACCGTGCT-3'

MK26A28 = 5'-CACCTGATGGACATCCTGAA-3'

При проведении реакций PCR с 50 пмольями праймеров MK23A28 и MK25A28 получили фрагмент с размером, приблизительно равным 180bp, показывающий, что вставочный Фрагмент, связанный сайтами Sac II в rHUB2№6, имеет правильную ориентацию. Использование праймеров MK25A28 и MK26A28 при скрининге PCR выполняет роль негативного контроля, продуцируя фрагмент с размером, приблизительно равным 180bp, только в конструкциях, содержащих Sac II связанный Фрагмент с неправильной ориентацией.

Последовательность плазмиды rHUB2№6 определяли, используя стандартные методики.

Плазмиды rHUB2№6 имела одну мутацию на позиции 378, которая нуждалась в репарации с целью получения первой четверти, содержащей требуемую последовательность.

Плазмиды rHGN№6 содержала требуемую последовательность для всей первой половины синтетического гена Bt. Плазмиды rHGN№6 была создана из Фрагмента Aat II/Nco I размером 3,4kb плазмиды rH1M5№2, лигированного с фрагментом Aat II/Nco I размером 500bp из плазмиды rHUB2№6.

Для идентификации клонов или частичных клонов синтетического гена, который содержит открытые

считывающие рамки, использовали вектор отбора по канамицину, описанный выше/. В кассету канамицина первым помещали четвертую четверть синтетического гена Bt. Плазмида pKM74-4 содержала фрагмент Ara 1/Cla размером 500bp из плазмиды BtP2 /которую предварительно трансформировали в штамм dam- E. coli /PO-100/, чтобы можно было резать с помощью Cla I/, лигированный с pUC:KM74, разрезанный с помощью Ara 1/Cla 1. Плазмида pKM74-4 проявляла устойчивость к канамицину, но позже было обнаружено, что она содержит две мутации-замены на позициях 1523 и 1634 /мутации описаны выше в разделе, касающемся клонирования четвертой четверти; они являются заменами, а не делециями или инсерциями/.

В плазмиду pKM74-4 была вставлена правильная первая половина синтетического гена Bt из плазмиды pIHG№6. Полученная в результате этого плазмида, названная pKm124, была создана из фрагмента Ara I/Bam HI размером 3,9Kb, выделенного из плазмиды pKM74-4, лигированной с Фрагментами AraI/Bam HI размером 1Kb из плазмиды pIHG№6. Плазмида pKm124 проявляла устойчивость к канамицину. Указанная плазмида содержала первую, вторую и четвертую четверти синтетического гена, формирующей одну открытую считывающую рамку.

Затем третью четверть синтетического гена клонировали в плазмиду pKM124. Первый функциональный клон в плазмиде pBt : Km№6 представлял собой функциональную копию указанного синтетического гена cysIA(b) в Km-кассете, которая проявляла устойчивость к канамицину, но которая содержала делецирующие мутации между третьей и четвертой четвертями. Плазмида pBt:Km№6 была создана из фрагмента лектора Ara I/Nco I pKM124 размером 5Kb, лигированного с фрагментом Ara I/ NcoI размером, приблизительно равным 500bp, из плазмиды pQCNI03 /плазмида pQCNI03 содержала мисмэтч -мутацию на позиции 1326, которая позже была репарирована. Контаминирующая нуклеазная активность, по-видимому, делетировала Ara I сайт между третьей и четвертой четвертями в плазмиде pBt : Km№6. Ген Bt, кодируемый синтетическим геном в плазмиде pBT : Km№6, имел приблизительно 50 - 60% активность нативных белков против Европейского зернового точильщика. С целью получения плазмиды, называемой 35S : Bt6, в 35s : экспрес-сизную кассету был вставлен фрагмент SmaI/Bam HI размером 2Kb из плазмиды pBt : Km№6.

Первоначально были получены два Функциональных -синтетических клон -Bt, каждый из которых имел мутации: плазмиды pBt : KMN№6 и pC1B4414. Плазмида pC1B4414 , которая проявляла 100% активность в испытаниях против Европейского зернового точильщика по сравнению с нативным геном, содержала замещающие мутации в третьей и четвертой четвертях на позициях 1323, 1523 и 1634.

Плазмиду pC134414 конструировали из двух плазмид, MG3.G4 №18 и IHG, описанных выше. Плазмиду MC3.G4№18 получали путём клонирования Фрагмента Ara 1/Kpn I плазмиды Bt.P2№1 в pQCNI03 /используя те же самые рестрикционные сайты/. При этом получали плазмиду, содержащую третью и четвертую четверти гена. Первую половину синтетического гена из плазмиды IHG разрезали Bam HI и Nco I и вставляли в плазмиду MC3.C4№18 / содержащую третью и четвертую четверти гена/. Полученная в результате плазмида pC1B4414 содержит Функциональный вариант синтетического гена. Будучи Функциональным, синтетический ген в этой плазмиде содержит три ошибки: на позиции 1326 / G замещено на C/, на позиции 1523 /A замещено на G/ и на позиции 1634 /T замещено на C/.

Четвёртую четверть плазмиды pC1B4414 замещали фрагментом Ara/Bat E II четвёртой четверти с размером 354bp, полученным из гибридизирующих, легирующих и расщепляющих рестрикцией олигомеров четвертой четверти, как это описано ранее, и выделяли фрагмент из 2% Nusleve геля агарозы. Плазмида pC1B4408 представляла собой клон синтетического гена Bt, полученный путем замещения фрагмента четвертой четверти в плазмиде pC1B4414 гибридизированным фрагментом четвертой четверти. Для вставки промотора CaMV 35S перед синтетическим геном Bt плазмиду pC1B4406 получали из фрагмента Eca NI/KpnI плазмиды p35SBt с размером 4Kb и фрагмента EcoNI/Kpn I с размером 1,8Kb плазмиды pC1B44C8.

Плазмида pC1B4406 имела 100% активность /по сравнению с белком нативного гена/ относительно ECB, но содержала замещающую мутацию третьей четверти синтетического гена на позиции 1323, в результате чего в аминокислоте произошло замещение лейцина на фенилаланин. Плазмиду pB3123№13 использовали для репарации указанной мутации.

Фрагмент третьей четверти плазмиды pBS123№13 получали из генерированного фрагмента гибридизированного олигомера с размером, приблизительно равным 479bp. Третьи четверти олигомеров U15-U20 и L15-L21 метили киназой, гибридизировали и лигировали, как это описано выше. Реакции FCR выполняли, как это описано выше, с праймерами P5/a/ и P6/v/ в течение 15 циклов. Продукт PCR обрабатывали протеиназой K с конечной концентрацией, равной приблизительно 50 мкг/мл в объеме, равном приблизительно 95мкл, в течение 30мин при температуре 37°C, а затем в течение 10мин при температуре 65°C /Nucleic Acid Research, Crowe et al., 19:194, 1991/. Затем продукт экстрагировали фенол/хлороформом и осаждали этанолом, используя стандартные методики, перед разрезанием рестриктазами Ara I и NcoI.

Фрагмент PCR Ara 1/Nco I с размером, равным приблизительно 450bp, лигировали с фрагменту вектора Ara 1/Nco I с размером 3,8Kb из плазмиды pIHG№6 с целью получения плазмиды pBS123№13. Плазмида pBS123№13 содержала требуемую последовательность третьей четверти, оптимизированной относительно кукурузы гена cysIA(b), размещенную в промежутке от позиции 1319 сайта Nsp I до позиции 1493 сайта Ara I. Указанный фрагмент Nsp I/Ara I с размером 170bp из плазмиды pB3123ЯЗ использовали в полностью активном синтетическом гене cysIA(b) плазмиды pC1B4418.

Вестерн-блот анализ

Анализ вестерн-блотирования различных трансформантов выполняли, используя неочищенные экстракты, полученные из E.coli, выращенного на селективных чашках. С помощью зубочистки культуры соскребывали с чашек; содержащих трансформанты, представляющие интерес, которые выращивали всю ночь при температуре 37°C. Позитивный контроль экспрессии гена Bt в E. coli осуществляла конструкция, называемая

У А 4 8 1 0 4 С 2

С 2 4 8 1 0 4 У А

плазмидой pC1B3069, которая содержала нативный' ген Bt-k , слитый с экспрессивным промотором CamV 35S растения. Плазида pC1B3069 также содержала промотор 35s, оперативно связанный с геном, устойчивым к гидромицину, промотор 35S с нитроном И Adh, оперативно связанный с геном aus,и промотор 35S , оперативно связанный с геном, кодирующим продукт нативного белка cryIA(b)IP Bt. Анализ предусматривал также негативный контроль штамма E.coli, не содержащего ген Bt. Культуры ресуспендировали в 100мкл загрузочного буфера, содержащего 62мМ Tris-HCl, pH6,8, 1% SDS, 0,0025% бромфеноловой сини, 10% глицерина и 7,5% меркаптоэтанол. После нагревания смеси при температуре 95 °C в течение 10мин препараты озвучивали ультразвуком в течение 1 - 3 секунд. Остатки центрифугировали в микрофуге при комнатной температуре в течение приблизительно 5мин и 10...15мкл каждого образца загружали на акриламидный 10% основной гель ниже 6% концентрирующего геля (LaernmII, Nature 227:680-685 (1970)).

После электрофореза, осуществляемого всю ночь при токе 10мА, белки переносили из геля в Immoblen мембрану /миллипара/. Перенос осуществляли, используя установку для электрофоретического блотирования /American BioNuclear, Emeryville, CA/, В буфер для переноса /20мМ Tris, 150мМ глицина и 20% метанола/ в течение 1,5 часов при токе равном 450мА.

Буферы для вестерн-блотирования включали:

- Блокирующий буфер: 2% твин-20
30мМ Tris-HCl, pH10,2
150мМ NaCl
- Промывочный буфер: 0,05% твин-20
30мМ Tris-HCL, pH10,2
150мМ NaCl
- Основной буфер: 100мМ Tris-HCl, pH9,6
100мМ NaCl
10мМ MgCl₂

После окончания переноса мембрану инкубировали в течение приблизительно 10минут в блокирующем буфере. Перед обработкой первого антитела осуществляли три 15-минутных промывания промывочным буфером. Первое антитело представляло собой очищенное иммуноаффинной хроматографией антитело кролика. или козла, приготовленное с использованием белка CryIA(b) в качестве антигена /Ciba-Gelgy, RTP, N.C.; Rockland Inc., Gilbertsville, PA.; Berkeley Antibody CO., Richmond, CA. /. Специфическое антитело cryIA(b) обрабатывали сразу же перед использованием лизатом штамма E.coli из фирмы Bio-Rad в объеме, равном 1мл, с 5мкг антитела, 50мкл лизата штамма E. coli в растворе промывочного буфера. Указанную смесь инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре перед разбавлением её в соотношении 1 : 30 до конечного разведения 1 : 6000 промывочным буфером. Инкубацию мембраны с первым антителом осуществляли при комнатной температуре в течение 1,5 часов.

Между первой и второй обработкой антитела осуществляли три десятиминутных промывания. Второе антитело представляет собой либо кроличий антикозлийный, либо козлий антикроличий конъюгат щелочной фосфатазы /Sigma, st. Louls, мо./.. Инкубацию со щелочной фосфатазой осуществляли при комнатной температуре в течение одного часа, используя разведение в промывочном буфере при соотношении 1 : 6000. Между обработкой второго антитела и созданием вестернблота проводили шесть 10-минутных промывок. Вестерн-блот создавали в 100мл проявительного буфера вместе с - 440мкл нитроглубога тетразолия в 70% диметилформамиде /75мг/мл/ и 330мкл 5-бром-4-хлор-индолил-фосфата в 100% диметилформамиде /50мг/мл/. После проведения указанной операции в течение 10...15мин мембрану промывали водой и сушили воздухом.

Пример 4: Кнструирование трансформирующих векторов.

Конструирование плазмиды pC1B710 и производных.

Кассетные плазмиды pC1B709 и pC1B710 с промотором CaMV 35S конструировали так, как это описано у Rothsteln et al., Gene 53:153-161 /1987/. Плазида pC1B710 содержала промотор Canv и последовательности терминации транскрипции для транскрипта РНК 35S /Covey et al., Nucl. Aclds. Res., 9:6735-6747/1981//.

Рестрикционный фрагмент Bgl11 с размером 1149bp дик CaMV /комплементарные пары 6494-7643 по Hohn et al., Current Topics In Microbiology and Immunology, 96:194-220 и Приложения А-Г /1982// выделяли из ДНК CalRV путем подготовительного электрофореза, агарозного геля как описано ранее. Фрагмент смешивали с ДНК BaiHI-расщепленной плазмиды pUC19, обработанной лигазой ДНК Т4, и трансформировали в штамм E. coli. /Следует отметить, что рестрикционный сайт BamHI в полученной плазмиде разрушали путем лигирования связывающих концов Bgl11 с "липкими" концами BamHI/.

Затем полученную плазмиду, названную pUC19/35S, использовали в олигонуклеотидо-направленном In-vitro мутагенезе с целью вставки .BamHI распознающей последовательности GGATCC, следующей сразу же за CaMV нуклеотидом 7483, в Хохг-мотиве. Полученная плазида pC1B710 содержала участок промотора CaMV 35S и участок терминации транскрипции, разделённые рестрикционным сайтом BamHI. Последовательности ДНК, вставленные в указанный сайт BamHI экспрессируют в растения с помощью этих регулирующих транскрипцию последовательностей CaMV. /Следует также отметить, что плазида pC1B710 не содержит никаких иницирующих трансляцию кодонов ATG между началом транскрипции и сайтом BamHI/.

Плазмиду pC1B710 модифицировали для продуцирования плазмиды pC1B709 путем вставки фрагмента ЗамHI, содержащего кодирующую последовательность для гигромицин феофототрансферазы из плазмиды pLG90 /Rothsteln et al., Gene, 53:153-161 /1987//, в. сайт BamHI.

Плазмиду pCIB709 модифицировали для продуцирования плазмиды pCIB996 за счёт удаления ATG из иницирующего кодона гена гигромицин фосфотрансферазы, используя стандартные приемы мутагенеза, вставляя при этом на указанное место рестрикционный сайт Bgl II. Полученную плазмиду pCIB996 затем модифицировали с целью удаления спайтов Bam HI, Sma II и Bgl I на 5'-нетранслированной лидерной области, где локализован 5' иницирующий кодон. В результате изменяется последовательность оснований ДНК с -TATAAGGATC CCGGGGGCA AGATCTGAGA TATG-Нуг на TATAAGGATC TGAGATATG-Нуг. Полученная плаزمида известна как pCIB3073.

С другой стороны, плазмиду pCIB710 модифицировали для продуцирования плазмиды pCIB900 путём вставки Фрагмента Bam HI -Bcl I плазмиды pCIB10/35SBt, содержащей кодирующую последовательность из 645 аминокислот, описанную ниже в Части С4, в сайт Bam HI плазмиды pCIB710 с целью создания плазмиды pCIB710/35SBt. Для вставки устойчивого к антибиотикам маркера плазмиду pCIB709 разрезали Sal I, лигировали адаптер Kpn I/ Sal I, а полученный продукт лигирования разрезали Kpn I. Фрагмент Kpn плазмиды pCIB709, содержащий устойчивый к 353/гигромизину ген, вставляли в сайт Kpn I плазмиды pCIB710/35SBt для получения плазмиды pCIB900.

К генам, используемым в качестве селективных маркеров, относится ген, устойчивый к гигромицину, описанный Roth -stein.-et al.,Gene 53: 153-161 /1987/. Ген гидромицина, описанный в этой работе, вводится BpUC -плазмиду, например, pCIB710 или pCIB709, и "экстра" ATG слева от избранного участка цепи ДНК из последовательности, кодирующей гигромицин трансферазу, удаляли с целью образования плазмиды pCIB996. Этот модифицированный ген плазмиды pCIB966 затем модифицировали для удаления сайтов Bgl II, Bam HI и SmaI из 5'-участка гена, используя стандартные способы молекулярной биологии для получения плазмиды pCIB3073.

Плазмиды pCIB932 представляет собой плазмиду на основе pUC19, содержащую химерный ген Рер-С:промотор/Bt/Рер-С:терминатор. Она составлена из фрагментов, выделенных из pPEP-10, субклона HindIII геномного клона, H1-лямбда-14, PNAS USA, 83:2884-2888 /1986/, гена кукурузы, кодирующего фермент PEP карбоксилазы, активный при фотосинтезе, и из плазмиды pCIB930, которая представляет собой фрагмент BamHI, содержащий укороченную форму из 645 аминокислот гена эндотоксина cysIAb в сайте BamHI плазмиды pUC18.

Фрагмент EcoRI-XhoI с размером 2,6kb из pPEP-10, содержащий полиА дополнительный сайт, из гена PEP-карбоксилазы, выделяли и переваривали Pst-I и Hinc II. Рестрикционный перевар лигировали с pUC18, переваренной PstI/HincII, трансформировали в E.coli, а трансформанты скринировали для обнаружения тех, которые содержат вставку pstI-HincII с размером 412bp в pUC18, при этом вставку контролировали с помощью секвенирования. Полученную плазмиду назвали pCIB931.

Ядерный ген, кодирующий изоэзими фосфоэнолпируват карбоксилазы /"Рер-С"/, описан у Hudpeth et al., Plant Molecular Biology, 12:579-589 /1989/. Плазмиду pCIB932 конструировали путем лигирования трех фрагментов. Первый фрагмент, содержащий терминатор PEP-С транскрипции, продуцировали путем переваривания плазмиды pCIB931 по полного переваривания с HindIII, частично с SphI и выделяли фрагмент разм.3098bp. Второй фрагмент, содержащий кодирующую последовательность эндотоксина Bt, продуцировали путем переваривания плазмиды pCIB930 с помощью NcoI и SphI и изолировали фрагмент с размером 1950bp. Третий фрагмент, содержащий промотор PEP-С, продуцировали путем переваривания pPEP-10 до полного переваривания с HindIII, частично с NcoI и выделяли фрагмент с размером 2,3kb. Лигирующую смесь трансформировали в штамм E.coli, идентифицировали трансформанты с правильной вставкой, а вставку контролировали с помощью секвенирования.

Для получения фрагмента с размером 4,9кб, содержащего кукурузный Рер-С : промотор/Bt/Рер-С : терминатор, плазмиду pCIB932 разрезали с помощью PvuII и очищали на 1%LGT агарозном геле в однократном ТАЕ. Линеаризованный вектор плазмиды pCIB3079 и вставку с размером 4,9кб из плазмиды pCIB932 лигировали, используя лигазу ДНК Т4, в LGT для получения плазмиды pCIB4401. Плазмиды pCIB4401 представляет собой кукурузный трансформирующий вектор, содержащий химерные гены:35s : промотор/PAT/35s : терминатор, Рер-С : промотор/Bt/Рер-С : терминатор и 35s : промотор/ AdhI №1 интрон/GUS/35s : терминатор.

Конструкция плазмиды pCIB246 /35s -Gus-35s /

Кассетный промотор CaMV 35s, pCIB246, конструировали следующим образом.

Рестрикционный сайт DdeI на нуклеотидной позиции 7482 генома CaMV /Pranck et al., Cell, 21:285-294 /1980/ модифицировали путем вставки олигонуклеотида с размером 48bp, содержащего несколько сайтов рестриктаз, включая сайт NcoI /CCMGG-/ , сайт SalI /GTCGAC/ и сайт SstI/GAGCTC/. Указанные измененные промотор CaMV 35S вставляли в вектор pUC19, который модифицировали с целью разрушения сайтов SstI и SalI вектора. Таким образом, промотор CaMV 35S плазмиды pCIB1500 содержал специфические сайты SstI и SalI, предназначенные для клонирования.

Плазмиду pCIB1500 переваривали с SstI/NcoI и лигировали с геном GUS, полученным из плазмиды pB1221 /Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA/. Сайт NcoI сливали с геном GUS таким образом, чтобы ATC сайта NcoI функционировал в качестве иницирующего кодона для трансляции гена GUS. Для 3'-конца химерного гена использовали сигналы терминации и полиаденилирования CaMV35S.

Конструкция плазмиды pCIB3069 /35S -Adhe-G-Ub-35S /

Плазмиду pCIB246 модифицировали путём добавления AdhI интрона номер 1 кукурузного гена алкогольдегидразы /AdhI/ /Dennis et al., Nucleic Acids Research, 12:3983-4000 /1984/ в сайт Sal I плазмиды pCIB246 для продуцирования плазмиды pCIB3007. AdhI интрон вырезали из кукурузного AdhI гена в качестве

фрагмента Bal I/Pst I и субклонировали в pUC18, который вырезали с помощью Sma I/Pst I, для получения плазмиды, названной Adh 1026. Плазмиду Adh 1026 разрезали с помощью Pvu II/Sae II, у фрагментов формировали тупые концы с помощью полимеразы ДНК T4, добавляли линкеры Sal I, используя стандартные методики, а фрагмент с размером, приблизительно равным 560bp, восстанавливали из 3% Nu Selve геля и лигировали в pUC18, разрезанной Sal I и обработанной фосфатазой. Adh интрон №1, сшитый с Sal1, в полученной плазмиде вырезали с помощью Sal I, очищали на геле и лигировали с разрезанной Sal1 и обработанной фосфатазой плазмидой pC1B246 для получения плазмиды pC1B3007.

Плазмиду pC1B3007 разрезали с помощью PstI и концы затупляли, используя полимеразу ДНК T4 /NEW England Biolabs/ в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученные молекулы с тупыми концами разрезали с помощью Sph I и фрагмент размером 5,8Kb с одним тупым концом и одним Sph-I-концом очищали на геле из низкоплавкой агарозы /LGT/, используя стандартные методики. Плазмиду pC1B900 разрезали с помощью Sma I/ Sph I и Фрагмент, содержащий ген 35S/Bt, очищали на LGT геле агарозы. Два очищенных гелем фрагмента лигировали с LGT агарозой, используя лигазу ДНК T4 при стандартных условиях. Полученные лигированные фрагменты трансформировали в E.coli, используя стандартные методики. Полученную плазмиду назвали pC133062. Существует два варианта этой плазмиды. Плазмида pC1B3062№1 имеет сайт Sma I, регенерированный там, где лигированы затупленные концы сайта Sma I и полимеразы T4. Наиболее вероятно, что это явилось следствием удаления с помощью полимеразы T4 нескольких комплементарных пар из сайта Sma I в течение реакции затупления.

Плазмиду pC1B3062№3 разрезали Kpn I и с помощью полимеразы ДНК T4 делали её тупоконечной, затем разрезали с помощью Pvu II для получения Фрагмента длиной 6,4Kb с тупыми концами, содержащего гены 35S/GUS и 35S/Bt. Указанный тупоконечный фрагмент лигировали с плазмидой pC1B3073, разрезанной Sma I, для получения плазмид pC1B3063 или pC1B3069. Плазмида pC1B3063 содержит такой же фрагмент, что был использован для получения плазмиды pC1B3063, но химерные гены в плазмиде pC1B3069 имеют одинаковую относительную ориентацию, отличную от ориентации геном в плазмиде pC1B3063. Эти плазмиды содержат а/ промотор 35S, оперативно связанный с устойчивым к гидролизину геном; б/ промотор 35S с Adh1 нитроном №1, оперативно связанный с геном GUS; и в/ промотор 35S, оперативно связанный с геном, кодирующим продукт синтетического инсектицидного белка Cry1A/b/ из Bacillus thuringiensis, как это описано выше. Пробы GUS.

Пробы GUS выполняют по существу так, как это описано в Jefferson, Plant Mol. Biol. Reporter, 5:387-405 /1987/. Как показано выше, плазмида pC13246 содержит промотор CaMV35S, сплитый с геном GUS. 5'-нетранслированный лидер указанного химерного гена содержит копию кукурузного Adh1 интрона №1. Он используется в данном случае в качестве средства трансформационного контроля. Хотя при каждой трансформации добавляли одинаковое количество плазмиды pC1B246, рассчитанная активность изменялась среди испытанных конструкций Bt. Величины, показанные ниже, являются усредненными для трёх репликаций. Плазмиду pC1B4407 испытывали дважды.

pC1B3069 28нМ мц/мкг/мин
pC1B4407 0,7нМ М/мкг/мин, 2,3нН МЦ/мкг/мин

Пример 5А: Анализ синтетического гена cry1A/b/ на инсектицидную активность к европейскому зерновому точильщику.

Синтетический ген cry1A/b/ плазмиды pC1B4414 в штамме E. coli исследовали на инсектицидную активность к Европейскому зерновому точильщику в соответствии со следующими правилами.

Жидкую искусственную пищу для насекомого очищали в чашке Петри размером 60мм, снабжённой крышкой Геллхана. После загустевания клетки E. coli, суспендированные в 0,1% тритона X-100, распластывали по всей поверхности с концентрацией 3×10^7 клеток/ см². Чашки высушивали воздухом. Затем десять Европейских зерновых точильщиков первой возрастной стадии, Ostrina nubilalis, с возрастом менее 12 часов размещали на поверхности пищи. Пробу инкубировали при температуре 30°C в полной темноте в течение 2...5 дней. В конце опыта записывали процент смертности. Положительным считали клон, который давал 50 или более процентов смертности, тогда как контрольные клетки E.coli давали 0...10% смертности.

Для сравнения испытывали нативный ген cry1A/b/ плазмиды pC1B3069 при той же концентрации. Клоны испытывали с пищей при концентрации 3×10^7 клеток/см²; 20 насекомых на один клон. Были получены следующие результаты:

Клон	Процент смертности
Контрольный	0
pC1B3069	100
pC1B4414	100

Эти результаты показывают, что инсектицидный кристаллический белок, полученный от синтетического гена cry1A/b/, демонстрирует большую активность к Европейскому зерновому точильщику по сравнению с такой активностью белка IP, полученного от нативного гена cry1A/b/. Другие плазмиды, содержащие синтетический ген cry1A/b/, исследовали аналогичным образом.

Пример 5АВ: Анализ белка Cry1A/b/ на инсектицидную активность к точильщику сахарного тростника.

Ген cry1A/b/ экспрессировали в E. coli и исследовали на инсектицидную активность к точильщику сахарного тростника /Diatrea sacchalis/ в соответствии с той же методикой, которую использовали для Европейского

зернового точильщика, описанную выше/ Результаты исследования обобщены в Таблице.

5

10

15

Таблица	
Проверка биологической активности белка Bt из E. Coll на точильщике сахарного тростника	
Концентрация белка /нг/г/	Процент смертности CryIA/b/
10	0
26	0
50	7
100	13
250	40
500	53
1000	80
LC50	380
95%	249 - 646

Приведенный результаты показывают, что инсектицидный белок, продуцированный геном Bt, оптимизированным относительно кукурузы, эффективен против точильщика сахарного тростника. Более высокие концентрации белка CryIA/b/, 250нг/г - 1000нг/г, достигаются в трансгенной кукурузе, полученной в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 6: выделение и трансформация синтетическим геном Bt протопласты кукурузы.
Исследовали экспрессию синтетического гена Bt лранзиентно трансформированные протопласты кукурузы. Методика выделения протопласт:

1. Содержимое 10 суспензионных культур двухдневной кукурузы 2717 линии 6 пипетируйте в стерильные пробирки объемом 50мл и отстаивали. Затем нее культуральные среды удаляли и набрасывали.
2. Клетки /в объеме 3...5мл/ ресуспндируйте в 30мл раствора фермента протопласты со следующим составом:
3% целлюлаза RS
1% мацерозим RIO в KMC буфере
KMC буфер /состав на 1-литр/

KCl 8,65г
MgCl - 6H₂O 16,47г
CaCl₂ – 2H₂O 12,50г
MES 5,0г

- pH5,6, стерилизация фильтрованием через микропористую мембрану
3. Хорошо смешайте клетки и поместите аликвотную смесь в чашках Петри размером 100 x 25мм, приблизительно 15 мл в чашку. Для переваривания с помощью ротационного шейкера перемешивайте в течение 4 часов.
 4. Пипетируйте 10мл KIC через микрофильтр с размером ячеек 100мкм. Отфильтруйте содержимое чашек через микрофильтр. Промойте микрофильтр равным объемом KMC.
 5. Пипетируйте осторожно отфильтрованные протопласты в 50-милдлитровые пробирки и центрифугируйте в течение 10 минут в центрийуте Вескман TJ-6 при 1000об/мин /500л/.
 6. Удалите надосадочную жидкость и осторожно ресуспенди-руйте пеллету в 10мл KMC. Соедините содержимое трех пробирок в одной пообирке и доведите объём до 50мл, доливая KMC.
 7. Повторяя вышеуказанные этапы, вновь центрифугируйте и промойте.
 8. Ресуспендируйте все промытые протопласты в 50мл KMC. Определите количество в гемоцитометре. Центрифугируйте протопласты и ресуспендируйте при 8 x 10⁶/мл в ресуспендирующем буфере /RS-буфер/. RS-буфер /состав на 500мл/

маннит 27,33г
CaCl₂ /0,1 М концентрированной/ 75мл
HER 0,5г

- pH5,8, стерилизация фильтрованием через микропористую мембрану. Методика трансформации протопласт:
1. Поместите 50мкг плазмидной ДНК /конструкции IP Bt, как синтетического/pC1B4407/, так и нативного /pCIB3063// в пробирки с 15мл полистироловой культуры. Поместите также 25мкг GUS-содержащей плазмиднрй ДНК /которая не содержит IPBt /pCIB246/ во все пробирки. Используются 3 репликации на одну конструкцию, подлежащую исследованию, при одной репликации, не содержащей ДНК, в качестве контрольной.

Bt конструкции: GUS конструкция:
pC1B3069 pC1B246
pC1B4407

2. Слегка перемешайте протопласты и поместите 0,5мл в пробирку.

3. Добавьте 0,5 мл РЕЕ-40 в каждую пробирку.

Состав РЕЕ-40:

0,4М маннита

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

pH8,0, стерилизация фильтрованием через микропористую мембрану.

4. Слегка перемешайте с целью объединения протопласт с РЕЕ. Подождите 30 минут.

5. Последовательно добавляйте 1мл, 2мл, и 5мл раствора W5 через 5-минутные интервалы. Состав раствора W5

154мМ

125 мМ $\text{CaCl}_2 - \text{H}_2\text{O}$

5мМ KCl

5мМ глюкозы

pH7,0, стерилизация фильтрованием через микропористую мембрану.

6. Центрифугируйте в течение 10 минут в центрифуге TJ-6 Весомая, приблизительно при 1000об/мин /500л /.

Удалите надоса-дочную жидкость,

7. Осторожно ресуспендируйте пеллету в 1,5мл среды FW и осторожно поместите в чашки Петри размером 35 x 10мм. Среда FW /состав на 1литр/:

соли MS 4,3г

200x B5 витай. 5мл

сахароза 30г

пролин 1,5г

маннит 54г

2,4Д 3мг

pH5,7, стерилизация фильтрованием через микропористую мембрану.

8. Инкубируете в течение всей ночи в темноте при комнатной температуре.

9. Выполните исследование вид, биопробы насекомых и ферментный иммуносорбентный анализ на протопластовых экстрактах, как это описано ниже.

Пример 7: Конструирование полноразмерного синтетического оптимизированного относительно кукурузы гена *CryIA/b/*.

Последовательность 4 представляет собой синтетическую оптимизированную относительно кукурузы последовательность, кодирующую полноразмерный инсектицидный белок *cryIA/b/* из *B.thuringiensis*. Укороченный вариант вышеуказанного гена представляет собой первую часть с размером, равным приблизительно 2Kb, этого гена. Остаток полноразмерного гена клонировали, используя методики, описанные выше. Указанная методика включает синтезирование олигомеров ДНК длиной от 40 до 90 NT, используя обычно 80 олигомеров в качестве среднего размера. Олигомеры очищали, используя стандартные методики ЖХВР или восстановления из полиакриламидного геля. Очищенные олигомеры метили киназой и гибридизировали с целью образования фрагментов с размером, приблизительно равным 500bp. Гибридизированные олигомеры могут быть амплифицированы, используя PCR-при стандартных условиях. Затем фрагменты с размером 500bp, полученные либо непосредственно из гибридизаций, из амплификации РСК, либо восстановленные из агарозных гелей после либо гибридизации, либо амплификации PCR, клонировали в плазмиду и трансформировали в *E. coli* используя стандартные методики.

Рекомбинантные плазмиды, содержащие желательные вставки, идентифицировали как это описано выше, используя PCR и/или стандартные методики минискрининга. Затем вставки, которые представляются правильными на основе их PCR и/или профиля рестриктазы, секвенируются с целью идентификации тех клонов, которые содержат требуемую открытую считывающую рамку. После этого фрагменты лигировали вместе с синтетической последовательностью с размером, приблизительно равным 2Kb, описанной в примере 2, с целью получения полноразмерного оптимизированного относительно кукурузы синтетического гена *cryIA/b/*, используемого для экспрессии высокого уровня белка *cryIA/b/* в кукурузе. Содержание 3 + С в нативном и синтетическом генах Bt:

Полноразмерный нативный 38,8%

Укороченный нативный 37,2%

Полноразмерный синтетический 64,8%

Укороченный синтетический 64,6%

Процент гомологии конечного укороченного варианта гена Bt. к гену использования кодона "чистой" кукурузы составляет 98,25%.

Пример 8: конструирование растительного экспрессируемого полноразмерного гибридного частично оптимизированного относительно кукурузы гена *CryIA/b/*.

Плаزمида pC1B4434 содержит полноразмерный ген *CryIA/b/*, включающий синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген *cryIA/b/* с размером, равным приблизительно 2Kb, с остатком /COOH терминальный кодирующий участок/ гена, выделенного из нативного гена. Таким образом, кодирующий участок представляет

собой химеру между синтетическим геном и нативным геном, но полученный в результате белок идентичен белку нативного белка *cryIA/b*. Синтетический участок состоит из нуклеотидов 1-1938 /аминокислоты 1-646/, а нативная кодирующая последовательность - из нуклеотидов 1939-3468 /аминокислоты 647-1155/.

Последовательность указанного гена показана на фиг.7. Карта плазмиды p01B4434 показана на фиг.8.

Для получения плазмиды pC1B4434 были сконструированы следующие олиго:

KE134A28 = 5'-GGTCACCCAC TACCACATCG ATCAAETATC CAATTTAETT GAGT -3'

KE135A28 = 5 '-ACTCAACTAA ATTGGATACT TGATCGAT6T GGTA6TCGGTC ACG-3'

KE136A28 = 5'-GCASATCTGA GCCTCTTAGGT ACCCAATAEC GTAACGT-3'

KE137A28 = 5'-GCTGATTATG CATCAGCCTAT-3'

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

MK05A28 = 5'-CAAAGGTACC CAATAGCGTA ACG-3'

MK35A28 = 5'-AACGAGGTGT ACATCGACCG-3'

Плазмиду pC1B4434 изготавливали, используя четырёхходовый лигирование с фрагментом размера 5,7Kb из плазмиды pC1B4418, с химерным фрагментом, полученным с помощью реакции PCR и обработанным Bst E II/Kpn I с размером 346bp, с фрагментом нативного *cryIA/b*/ обработанного KpnI/NsiI размером 108bp из плазмиды pC1B1315 полученным, при PCR фрагментом Nsi I/Bgl II с размером 224bp. Для лигирования и трансформации выбирали стандартные условия, описанные ранее.

Фрагмент слияния синтетического нативного гена изготавливали в два этапа, используя реакцию PCR. Первый фрагмент слияния с помощью PCR с размером 253bp изготавливали с использованием 100 пмоль, олигомеров KE134A28 и MK04A28 с приблизительно 200нг нативной матрицы *cryIA/b* в 100-микролитровом объёме с 200мM каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата /dNTP/, IX буфера PCR/Perkin Elmer Cetus/, 20% глицерина и 5 единиц полимеразы Taq/ Perkin Elmer Cetus/. Реакцию PCR, выполняли при следующих условиях: 1 минуту при температуре 94°C, 1 минуту при температуре 55°C, 45 секунд при температуре 72°C с удлинением 3 в течение 3 секунд при 25 циклах. Фракцию /1%/ указанной первой реакции PCR, использовали в качестве матрицы наряду с 200нг синтетической ДНК для получения полного фрагмента слияния синтетического нативного гена с размером 351bp. Олигомерами, используемыми в качестве праймеров PCR во второй реакции PCR, являлись 50 пмоль MK35A28, 50 пмоль MK04A28 и 25 пмоль KE135A28. Состав смеси и параметры реакции PCR те же, что и перечисленные выше. Полученный фрагмент слияния синтетического нативного гена с размером 351bp обрабатывали протеиназой K при общей концентрации 50мкг/мл и экстрагировали фенол/хлороформом с последующим осаждением этанолом перед разрезанием с помощью Bst E II/Kpn I, используя стандартные условия.

Фрагмент полученный с помощью PCR и обработанный, Nsi I/Bgl II с размером 224bp, использованный для получения pC1B4434, создавали, используя 100 пмоль олигомеров KE137A28 и KE138A28 и 200нг нативного гена *cryIA/b*/ в качестве матрицы в 100мкл объёме с тем же составом смеси и параметрами реакции PCR, что и перечисленные выше. Нативный фрагмент *cryIA/b*/ полученный с помощью реакции PCR, с размером 230bp, обрабатывали протеиназой K, экстрагировали фенол/хлороформом и осаждали этанолом, как это описано выше, перед разрезанием его с помощью Nsi I/Bgl II.

Плазмиду pC1B4434 трансформировали в кукурузные протопласты так, как это было описано выше. Для сравнения в качестве контрольных использовали протопласты 2717 линии 6 с плазмидами pC1B4434 и pC1B4419. Результаты приведены ниже:

	нг Bt/мг белка
4419 /35S/	14 400 ± 2100
4434 /полноразмерная/	2200 ± 900

Результат = 13нг Bt/мг белка для нетрансформированных протопластов. Результаты показывают, что плазида pC1B4434 экспрессирует на уровне, равном приблизительно 15% от экспрессии плазмиды pC1B4419.

Вестерн блот-анализ показывает, что по меньшей мере одна треть белка *cryIA/b*/, продуцированного плазмидой pC1B4434, имеет размер 130kD. Таким образом, значительное количество полноразмерного белка *cryIA/b*/ продуцируется в клетках кукурузы при экспрессии плазмиды pC1B4434.

ПРИМЕР 7: КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ ГЕНОВ *CRYIA/b*/, КОДИРУЩИХ ТЕМПЕРАТУРОУСТОЙЧИВЫЙ БЕЛОК

Конструкции плазмид pC1B5511-5515, каждая из которых содержит полноразмерный ген *cryIA/a*/, описаны ниже. В этих последовательностях делегация из 26 аминокислот между аминокислотами 793 и 794, KCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSRDGE, присутствующая в *cryIA/a*/ и *cryIA/c*/, но не в *cryIA/b*/, восстановлена. Ген в плазмиде pC1B5513 является синтетическим; другие четыре гена являются гибридными и, таким образом, являются частично оптимизированными относительно кукурузы.

Конструирование плазмиды pC1B5511.

Указанная плазида является производной плазмиды pC1B4434. Карта плазмиды pC1B5511 показана на фиг.10. Сегмент ДНК размером 435 bp между комплементарными парами 2165 и 2590 сконструировали путем гибридизации синтетических олигомеров, предназначенных для выполнения роли верхней и нижней цепи, как это было описано выше для конструкции укороченного гена *cryIA/b*/. Указанный сегмент синтетической ДНК синтезировали, используя стандартные методики, известные специалистам в данной области, при этом указанный сегмент включает делецию из 26 аминокислот, которая, как выявлено, встречается в естественном состоянии в белке *cryIA/b* в *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1. Полный инсерционный сегмент ДНК использует

преимущества оптимизированного относительно кукурузы кодона для кодирования аминокислот. 26 аминокислот, используемые для восстановления естественно встречающейся делеции, вводили внутрь указанного фрагмента. Их вводили, начиная от позиции 2387 между сайтом KpnI на позиции 2170 и сайтом XbaI на позиции 2508/2586 в плазмиде pC1B5511/ плазмиды pC1B4434. Плазмиду pC135511 конструировали путём трёхходового лигирования, используя фрагмент с размером 3,2Kb, полученный рестрикционным перевариванием плазмиды pC1B4434 с помощью SphI и KpnI фрагмент с размером 3,8Kb, полученный перевариванием плазмиды pC1B4434 с помощью SphI и XbaI и фрагмент с размером 416bp, полученный перевариванием синтетической ДНК, описанной выше, с помощью KpnI и XbaI. Ферментативные реакции выполняли при стандартных условиях. После лигирования смесь ДНК трансформировали в подходящие клетки E.coli, используя стандартные методики. Трансформанты селектировали из L-агаре, содержащем 100мкг/мл ампицилина. Характеристики плазмид в трансформантах определяли, используя стандартные методики минискрининга. Последовательность восстановленного гена *cryIA/v*, копирующая термостойчивый белок *cryIA/v*, приведена на фиг.9.

Конструирование плазмиды pC135512.

Конструкция указанной плазмиды является производной плазмиды pC1B4434. Карта плазмиды pC1B5512 показана на фиг.12. Для репарации делеции 26 аминокислот приготавливали ДНК, используя стандартные методики синтеза ДНК и ферментативной реакции. Три кассеты двухцепочечной ДНК, pGFCas1, pGFCas2 и pGFCas3, каждая из которых имеет размер 300bp, приготавливали и использовали для замещения участка, расположенного между рестрикционным сайтом BstEII на позиции 1824 и сайтом XbaI на позиции 2508, при этом кассеты включали вставку дополнительных 78bp, которые кодировали недостающие 26 аминокислот /описанные выше для плазмиды pC1B551T в плазмиде pC1B4434/. Указанные кассеты конструировали такими, чтобы они содержали кодоны, оптимизированные относительно кукурузы, одновременно обеспечивая 100% аминокислотную идентичность с инсектицидным белком. Каждую из этих кассет клонировали в сайт EcoRV блюскрипт-вектора /стратаген/ с помощью стандартных методик. Три кассеты конструировали так, чтобы они содержали перекрывающиеся рестрикционные сайты. Кассета 1 имела рестрикционные сайты BstEII на 5'-конце и EcoRV на 3'-конце; кассета 2 имела сайт EcoRV на 5'-конце и сайт ClaI на 3'-конце; кассета 3 имела сайт ClaI на 5'-конце и сайт XbaI на 3'-конце. Кассеты по отдельности клонировали в блюскрипт а затем полный фрагмент с размером 762bp собиорали лигированием, используя стандартные методики. Плазмиду pC115512 собирали, используя указанный фрагмент с размером 762bp и лигируя его с фрагментом с размером 6,65Kb, полученным путём полного переваривания плазмиды pC134434 с помощью BstEII и частичного переваривания с помощью XbaI. С другой стороны, может быть использовано четырёхходовое лигирование, в котором применяется тот же вектор и указанные три кассеты, переваренные специфическими ферментами. Ферментативные реакции выполняли при стандартных условиях. После лигирования смесь ДНК трансформировали в подходящие клетки E.coli, используя стандартные методики. Трансформанты селектировали на L-агаре, содержащем 100мкг/мл ампицилина. Характеристики плазмид в трансформантах определяли, используя стандартные методики минискрининга. Полученная плазида является плазмидой pC115512. Последовательность репарированного гена *cryIA/v* показана на фиг.11. Указанный репарированный ген *cryIA/v* отличается от гена, содержащегося в плазмиде pC1B5511, тем, что больший участок области кодирования *cryIA/v* оптимизирован для экспрессии кукурузы за счет использования преимущественно кукурузных кодонов.

Конструирование плазмиды pC1B5513.

Указанная плазида содержит репарированный ген *cryIA/v*, выделенный из плазмиды pC1B5512. Карта плазмиды pC135513 показана на фиг.14. Участок 3' из сайта XbaI на позиции 2586 до конца гена /сайт BII на позиции 3572/ полностью заменяли оптимизированными относительно кукурузы кодонами. Указанный участок синтезировали, используя стандартные приемы синтеза, ДНК и ферментативной реакции, хорошо известной специалистам в этой области, в качестве четырех кассет двухцепочечных ДНК /кассеты № 4, 5, 6, 7/. Соседние кассеты имеют перекрывающиеся рестрикционные сайты для облегчения связи между кассетами. Указанными сайтами являются сайты XbaI и XhoI на 5'- и 3'-концах кассеты 4; сайты XhoI и SacI на 5'- и 3'-концах соответственно кассеты 5; сайты SacI и BstXI на 5'- и 3'-концах соответственно кассеты 6; сайты BstXI и BglII на 5'- и 3'-концах соответственно кассеты 7. Как это описано для плазмиды pC135512, кассеты клонировали в тупоконечный сайт EcoRV блюскрипт-вектора /стратаген/ и полноразмерный "репарированный" ген *cryIA/v* клонировали либо путем последовательной сборки вышеуказанных кассет в блюскрипт с последующим лигированием полного синтетического участка с размером 967bp с фрагментом размером 6448bp, полученным путем полного переваривания плазмиды pC1B5512 с помощью BglII и частичного переваривания с помощью XbaI. С другой стороны, плазмиду, содержащую полноразмерные гены, получали пятиходовым лигированием каждой из четырех кассет /после расщепления соответствующими ферментами/ и того же вектора, как это указано выше. Последовательность полноразмерного "репарированного" гена *cryIA/v* показана на фиг.13. Белок, закодированный различными синтетическими и синтетически/нативными химерами кодирующего участка, кодирует тот же белок. Указанный белок является термостойчивым вариантом *cryIA/v*, продуцированного путем репарирования естественно встречающейся делеции 26 аминокислот, выявленной в гене *cryIA/v* из *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1. 1 когда область гомологии сравнивали либо с дельта-эндоксами *cryIA/v*, либо с *crvIA/c* из *Bacillus thuringiensis*.

Конструирование плазмиды pCIB5514

Эта плазида является производной плазмиды pCIB4434. Карта плазмиды pCIB5514 показана на фиг.16. Она изготовлена с использованием кассеты №3 синтетической ДНК /см. выше/, содержащий оптимизированную

относительно кукурузы последовательность участка между сайтом ClaI /позиция 2396/, выявленном на термоустойчивом участке из 26 аминокислот, и сайтов XbaI на позиции 2508 в плазмиде pCIB4434 /2586 в плазмиде pCIB5511/. Участок между позицией 2113 плазмиды pCIB4434 и местом соединения термоустойчивого участка амплифицировали PCR, используя в качестве матрицы плазмиду pCIB4434. При этом имеют место следующие параметры праймеров:

прямой: 5'-GCACCGATATCACCATCCAAGGAGGCGATGACGIATTCAAAG-3'

обратный; 5'-AGCGCAICGATTTCGGCTCCCCGCACTTGCCGATTGGACTTGGGGCTGAAAG-3'.

Затем продукт PUR переваривали с помощью рестриктаз KpnI и ClaI и лигировали в четырёхходовой реакции с Фрагментом с размером 189bp, полученным путём переваривания кассеты 3 с помощью ClaI и XbaI, фрагментом плазмиды pCIB4434 с размером 3,2Kb переваренным SphI и KpnI, и фрагментом плазмиды pCIB4434 с размером 3,8Kb, полученным путем переваривания с помощью SphI и XbaI. Ферментативные реакции выполняли в стандартных условиях. Продукт лигирования трансформировали в подходящие клетки E. coli, селектированные ампицилином и скринированные с использованием стандартных методик, описанных выше. Последовательность сепарированного гена cysIA/в/, содержащегося в плазмиде pCIB35514, показана на фиг.15.

Конструкция плазмиды pCIB5515.

Плаزمида pCIB4434 была модифицирована путем добавления термоустойчивого элемента Gelser/Geiser TSE / с размером 78bp, описанного выше, между сайтом KpnI /2170bp/ и сайтом XbaI /2508bp/ на участке нативного Btk. Точный инсерционный сайт начинается на нуклеотиде №2379. Участок, содержащий Gelser TSE, амплифицировали двумя циклами реакций PCR, т.е. фрагментом KpnI - Gelser TSE и фрагментом Gelser TSE – XbaI.

Праймер PCR №1: /сайт KpnI /

5' - ATTACGTTAC GCTATTGGGT ACCTTTGATG -3'

Праймер PCR №2: /низ Gelser TSE/

5' - TCCCCGTCCC TGCAGCTGCA GTCTAGGTCC GGGTTCCTACT CCAGGTGCGG AGCGCATCGA TTCGGCTCCC CGCACTTGCC GATTGGACTT GGGGCTGA - 3'

Праймер PCR №3: /верх Gelser TSE/

5'- CAAGTGCGGG GAGCCGAATC GATGCGCTCC GCACCTGGAG TGCAACCCGG ACCTAGACTG CAGCTGCAGG GACGGGGAAA AATGTGCCCA TCATTCCC - 3'

Праймер PCR №4: /сайт XbaI /

5'- TGGTTTCTCT TCGAGAAATT CTAATTTC - 3'

После амплификации фрагменты PCR были обработаны /KpnI + ClaI / и /ClaI + XbaI / соответственно. Указанные два фрагмента были лигированы с плазмидой pCIB4434, обработанной KpnI и XbaI. Полученная в результате конструкция pCIB5515 представляет собой плазмиду pCIB4434 с элементом Gelser TSE и экстра сайтом ClaI, фланкированным с помощью KpnI и XbaI. Ген плазмиды pCIB5515 показана на фиг. 38. Ген cysIA/в/, содержащийся в указанной плазмиде, который кодирует термоустойчивый белок cysTA/н/, показан на фиг. 37.

Способы выделения и определения характеристик преимущественно – сердцевинного корового промотора приведены в нижеописанных примерах 9 - 20.

Пример 9. Выделение РНК и нозерн-блоты.

Всю РНК выделяли из растений, выросших в условиях теплицы. Всю РНК выделяли способом, описанным Kramer et al., Plant Physiol., 90:1214-1220 /1990/ из следующих тканей кукурузы линии Фанка 5N 984: 8, 11, 15, 25, 35, 40 и 60-дневных зеленых листьев; 8, 11, 25, 35, 39, 46, 60 и 70-дневной сердцевин; 60- и 70-дневных опорных корней кукурузы линии Фанка 5N 984; 60- и 70-дневных оболочек и колоса линии 5N 984. РНК также выделяли из 14-дневных корней 211Д и из развивающегося семени с недельными интервалами в течение одной-пяти недель после опыления. Поли А + РНК выделяли, используя олиго-dT, как описано Santbrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual /2-ое изд./, 1989, и нозерн-блотирование проводили также по Sambrook et al, используя либо полную РНК /30мкг/, либо поли А + РНК /2 - 10мкг/. После электрофореза РНК блотировали на мембраны Nitroplus 2000 /Micron Separations Inc/. РНК связывали с фильтром, используя страталинер /стратаген/ при 0,2мДж. Нозерн-блоты были зондированы коровым фрагментом EcoRI, выделенным из 8 - 2 кДНК TRpA/, с размером 1200bp, используя 0,8% агарозу с низкой температурой плавления в буферной системе TBE. Нозерны гибридизировали и промывали, а фильтры экспонировали на плёнку, как это описано в примере 10 "Изоляция клонов кДНК".

Пример 10. Изоляция клонов кДНК.

Синтез первой цепи кДНК осуществляли, используя систему 1 обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц /AMV/BRL при условиях, определённых поставщиком /Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD/. В данном случае 25мкл проб, содержащих 50мМ Tris-HCl, pH8,3, 20мМ KCl, 1мМ ДДТ, 6мМ MgCl₂, 1мМ каждого dNTP, 0,1 олигомера /тимидин,dT/ 12 - 18, 2мкг сердцевинной поли А+ РНК, 100мкг/мл альбумина бычьей сыворотки /BSA/, 50мкг/мл актиномина Д, 8 единиц ингибитора плацентарной РНКазы, 1мкл /10мМ Ки/мл/ 32P dCTP > 3000мКи/мл в качестве изотопного индикатора и 30 единиц обратной транскриптазы AMV инкубировали при температуре 42°C в течение 30 минут. Дополнительно добавили KCl до получения концентрации, равной 50мМ и продолжили инкубирование ещё в течение 30 минут при температуре 42°C. Для получения конечной концентрации, равной 100мМ, вновь добавили KCl. Для поддержания начальной концентрации других компонентов с прибавлением десяти дополнительных единиц добавили дополнительный реакционный буфер AMV обратной транскриптазы и продолжили инкубирование при температуре 42°C ещё 30

минут. Синтез второй цепи выполнили, используя систему синтеза кДНК Riboclone с линкерами Eco RI /Promega, Madison, WI/. Двухцепочечную кДНК сортировали по размерам на 1% геле агарозы, используя Tris-борат-ЭДТК буфер, как это описано Sambrook et al., и выделяли образцы с размером, равным приблизительно 1,2К. кДНК фракционировали по размеру, используя диэтиламиноэтиловую /DEAE/ мембрану NA45, чтобы оставить те молекулы, размер которых равен приблизительно 1000bp или более. Фракционирование проводили при условиях, определенных поставщиком /Schleicher и Schuell/. Фракционированные по размеру кДНК лигировали с лямбда Zap II вектором/Stratagene, La Jolla, CA/ и заключали в лямбда-частицы, используя Giga-jarnc II Plus/Stratagene, La Jolla, CA/. Неамплифицированная библиотека имела титр 315 000 бляшкообразующих единиц /pfu/, тогда как амплифицированная библиотека имела титр 3,5 миллиарда/мл, используя клетки PLK-F'.

Рекомбинантный фаг высевали при плотности 5000pfu на чашках L-агара размером 150 x 15мм. Всего было скринировано 50000 фагов, используя отпечатки из каждой чашки и пробы первой цепи кДНК, образованной либо из мРНК, выделенной из сердцевин, либо из мРНК, выделенной из семян. Отпечатки выполняли так, как это описано Sambrook et al., используя нитроцеллюлозные фильтры. ДНК фиксировали на фильтре путём ультрафиолетовой сшивки с помощью страталинкера /Stratagene, La Jolla, CA/ при мощности 0,2мДж. Предгибридизацию и гибридизацию фильтра проводили в 10-кратном растворе Денхардта, 150мкг/мл гидродинамически фрагментированного ДНК спермы лосося, 1% додецилсульфат натрия /SDS/, 50мМ фосфата натрия, pH7,0, 5Мм, ЭДТК, 6-кратный раствор хлорида и цитрата натрия /SSC/, 0,05% пироглосфата натрия. Предгибридизацию проводили при температуре 62°C в течение 4 часов, а гибридизацию - при температуре 62°C в течение 18 часов /на ночь/ при 1 миллионе срм/мл в объёме 40мл. Фильтры промывали в 500мл двукратного SSC, 0,5% SDS при комнатной температуре в течение 15 минут, затем при температуре 63°C в 0,1-кратном SSC, 0,5% SDS течение 30 минут для каждого промывания. Пробы ДНК, меченые радиоактивными изотопами, изготавливали, используя систему ник-трансляций и удаляли пробы, не имеющие радиоактивных меток, используя "ник"-колонки /Pharmacia/. Фильтры экспонировали ночью на рентгеновскую пленку Кодак X-Omat AR с помощью Cronex Lightning Plus усиливающих экранов при температуре -80°C. Гибридизируемые и не гибридизируемые пятна были очищены для дальнейшего характеристики.

Пример 11. Изоляция геномных клонов.

Геномную ДНК из инбредной линии 211Д Фанка кукурузы выделяли так, как это описано -Shure et al., Cell 35:225-233 /1988/. ДНК подвергали частичному перевариванию с помощью Sau 3A, а затем фракционировали по размеру на 10...40% сахарозные градиенты с помощью центрифугирования в роторе Beckman SW40 при температуре 20°C в течение 20 часов при 22000об/мин. Фракции с размером в диапазоне от 9 до 23Kb группировали и осаждали этанолом. Лямбда Dash, II /стратаген/, разрезанный с помощью Bam HI использовали, как это предписывается поставщиком. Библиотека была скринирована неамплифицированной, при этом было скринировано всего 300000pfu в условиях, описанных выше. Библиотеку зондировали с использованием специфически-сердцевинного /TrpA/ клон кДНК 8 - 2, плазмиду pC1B5600 которого идентифицировали в дифференциальном сите библиотеки кДНК. Выделенные клоны были очищены и были приготовлены репрезентативные количества фага, используя Lambdasorb/Promega/ как предписывалось поставщиком. Изолированные геномные клоны переваривали с помощью Eco RI и Фрагмент EcoRI с размером 4,8kb субклонировали в блюскрипт-вектор /стратаген/.

Пример 12. Последовательность ДНК и компьютерный анализ.

Секвенирование нуклеотидов осуществляли, используя способ, описанный Sanger et al., PNAS, 74:5463-5467 /1977/. Секвенирующие праймеры синтезировали на синтезаторе ДНК модели 3808 фирмы Applied Biosystems, используя стандартные условия. Реакции секвенирования осуществляли с использованием системы Sequenase/US Biochemical Corp/. Гелевый анализ выполняли на 40см геля 6% полиакриамида с 7М мочевины в Tris-борат- ЭДТК буфере /BRL Gel -Mix6/. Анализ последовательностей и сравнение с последовательностями в генобанке проводили с использованием программы анализа последовательностей, разработанной группой генетического компьютерного анализа Висконсинского университета /UUUWGC/.

Пример 13. Картирование сайта инициации транскрипции.

Удлинение праймера выполняли в соответствии с методикой, описанной Metraux et al., PNAS, 86:896-900 /1988/. Другими словами, 30мкг общей РНК кукурузной сердцевин гибридизировали праймером в 50ММTris, pH7,5, 40мМ KCl, 3Мм MgCl₂ /буфер RT/ путём нагревания до температуры 80°C в течение 10 минут и медленного охлаждения до температуры 42 °C. РНК/праймерную смесь оставляли на всю ночь для осуществления гибридизации. Кроме буфера RT добавляли ДТТ до 6мМ, BSA до 0,1мг/мл, арапазин в количестве 4ед/мл и dNTP до 1мМ каждого. Затем добавляли 8 единиц обратной транскриптазы AMV и пробу выдерживали в течение 1 часа при температуре 37°C. Использованный праймер представлял собой 5'-CCGTTCTGTTCTCCTTCGTC CAGG-3' и начинался в месте, сдвинутом относительно начала транскрипции на +90. См. фиг.29А, Секвенирующий лэддер, использующий тот же праймер, что и в реакции удлинения праймера, образовали, используя геномный клон с размером 4,8kb с целью определения сайта инициации транскрипции. Реакцию секвенирования выполняли, как это описано в примере 12.

Предохранение, от РНКазы использовали для определения того, является ли последовательность с размером 371bp на интервале от +2bp до +373bp /начало кДНК/ соприкасающейся или содержит один или более интронов. Фрагмент SphI-NcoI с размером 385bp, расположенный на интервале +2bp...+387bp относительно инициации транскрипции, показанный на фиг. 29В, клонировали в pGEN-5Zf/+ /Promega/ и транскрибировали, используя систему Riboprobe Gemini /Promega/ из промотора SPb для образования радиоактивных зондов антисмысловой РНК по методике, определённой поставщиком. Защиту от РНКазы обеспечивали так, как это описано Sambrook et al. pBR322 /разрезанный с помощью HpaII и меченый на конце с помощью 32P-dCTP/ и

фрагмент Кленова использовали как маркёры молекулярного веса. Гели представляли собой 6% акриламид/7М мочевины /BRL Gel-Mix 6/ и потребляли 60Вт постоянной мощности. Пример 14. Геномные саузерн-блоты.

Геномную ДНК выделяли из кукурузной линии 211Д, используя методику, описанную Shure et al., см. выше.

Для каждого переваривания рестриктазы использовали 8мкг геномной ДНК. В буфере, предлагаемом поставщиком, использованы следующие ферменты: BamIII, EcoRV, EcoRV HInd-111, SacI. Клон номер 8 - 2 сердцевинной кДНК использовали для оценки числа копий гена. Переваренную ДНК исследовали на 0,7% геле агарозы, используя буфер Tris - борат- ЭДТК. Для облегчения переноса ДНК с высоким молекулярным весом гель прсднлрительно обрабатывали 250мМ HCl в течение 15 минут. ДПК переносили на мембрану Nitroplus 2000, а затем зондировали сердцевинной ДНК 8 - 2. Блот проминали способом, описанном в призере 10.

Пример 15. Материал и способы PCR.

Пробы PCR предварительно готовили, используя набор реактивов для амплификации ДНК GeneAmp и рекомбинантную Tag ДНК-полимеоазу Amplitag /Perkin Elmer Cetus/. Условия проведения реакции были следующие: от 0,1 до 0,5мкМ каждого из двух праймеров, используемых на одну пробу, 25нг сердцевинного Фрагмента EcoRI с размером 4,8Kb в блюскрипт-векторе и реакционная смесь PC3L, оговоренная поставщиком, при общем объеме, равном 50мкл, в реакционной пробирке Geneamp /Perkin Elmer Cetus/ объемом 0,1мл. Для денатурации при температуре 94°C в течение 60с, гибридизации при температуре 55°C в течение 60с и расширения при температуре 72°C в течение 45с с последующим удлинением на 3с в каждом цикле при общем числе циклов, равном 30, применяли датчик термоцикла ДНК /Perkin Elmer Cetus/ работающий по программе этап-цикл. Использовали следующий набор праймеров: 1.83 x 84, от -429bp до -2bp; 2.49 x 73, от -69bp до + 91bp; 3.38 x 41, от +136bp до + 258bp; 4.40 x 75, от +239bp до + 372bp. Указанные праймеры отмечены на фиг.24.

Пример 16. Выделение преимущественно-сердцевинного гена.

Библиотеку кДНК, выделенную из сердцевинной мРНК, клонировали в лямбда -Зар и скринковали, используя первую цепочку кДНК, выделенной из мРПК сердцевинны или семени. Клоны, которые были гибоидизированы только с сердцевинным зондом, были очищены от пятен и вновь скринированы. Клоны, подвергнутые второму скринированию, использовали в качестве зондов в нозерн-блотах, содержащих РНК из различных тканей кукурузы.

Пример 17. Структура гена и анализ его последовательности.

Вставку с размером 1,2Kb кДНК клона 8 - 2 секвенировали, используя дидеокси метод, описанный Сангером и др. /см. выше/. Аналогично был секвенирован геномный эквивалент, содержащийся во фрагменте EcoRI с размером 4,8Kb блюскрипта, обозначенного как pC1B5601. Указанная информация свидетельствует о том, что геномная копия кодирующего участка перекрывает 1,7Kb и содержит пять нитронов. Транскрипт мРНК представляет собой шесть экзонов. Это показано на фиг.24. Размер экзонов находится в диапазоне от 43bp до 313bp, а размер интронов изменяется от 76bp до 130bp. Полная последовательность гена и её соответствующая образованная аминокислотная последовательность показаны на фиг.24.

Указанный ген кодирует белок из 346 аминокислот с молекулярной массой, равной приблизительно 38кД. Как видно из таблицы 1, предсказанный белок показывает 62% подобие и 41% идентичность с субтединичным белком Pseudomonas aeruginosa имеет высокую гомологию с белками trpA других организмов.

Таблица 1		
Сохранение последовательностей ТгрА между геном ТкрА кукурузы и другими организмами		
Сравниваемые организмы	% аминокислотного подобия	% аминокислотной идентичности
Haloferax volcanii	56,4	36,1
Methanococcus voltae	58,1	35,1
Pseudomonas aeruginosa	62,5	41,8
Nenrospora crassa	61,4	39,3
Saccharomyces cerevisiae	56,7	36,1

Группирование подобия, I = L = M = V, Д = E, F = Y, K = R, N = Q, S = T. Подобие и идентичность были выявлены, используя программу GAP, разработанную Висконсинским университетом.

Crawford et al., Ann. Rev. Microbiol., 43:567-600 /1989/, на которых делается ссылка в данном описании, обнаружили участки сохраненных аминокислот в бактериальных генах trpA. Такими аминокислотами являются аминокислоты 49 - 58, аминокислоты 181 -184 и аминокислоты 213 - 216, причем остаток гена показывает большую изменчивость, чем в последовательности TrpB. Рассмотрение известных trpA белков с белком ТгрА кукурузы /не показан/ показывает, что гомология между геном кукурузы и другими белками trpA значительна. Кроме того, она сравнима с уровнем гомологии, наблюдаемой, пря сравнении других белков ТгрА друг с другом, как это описано у Crawford et al., /см. выше/.

Для определения локализации сайта начала транскрипции, а также того, присутствовали или нет интроны в этой области, был проведен нозерн-анализ с использованием четырех фрагментов, генерированных с помощью цепной полимеразной реакции /PCR/, с размером от поиблизительно 122bp до 427bp из области в интервале от -429bp до +372bp. Результаты нозерн-анрлиза показали, что зонды PCR II., III, IV гибридизированы до полной сердцевинной РНК, а зонд I не гибридизирован. Это свидетельствует о том, что транскрипция начиналась на участке -69bp...+90bp. Для более точного определения места сайта инициации транскрипции использовали праймер удлинения. Из фиг.29А видно, что если для поаймера удлинения использовали праймер /№73/, расположенный в позиции +90bp относительно начала транскрипции, сайт инициации транскрипции

располагался в позиции +1, 1726 геномной последовательности.

Первый антитимоцитарный глобулин /ATG/ из сайта инициации транскрипции располагался в позиции +114bp. Указанный ATG предназначен, как ожидают, для того, чтобы служить в качестве сайта инициации трансляции. Этот ATG начинает открытую считывающую рамку, выявленную в клоне кДНК, Первые 60 аминокислот этой предсказанной открытой считывающей рамки имеют значительное сходство с хлоропластовым транзитным пептидом. См. Berlyn et al., PNAS 86:4604-4608 /1989/ и Neumann-Karlin et al., EMBOJ., 5:9-13 /1986/. Этот результат позволяет предположить, что указанный белок направлен к пластиде и, вероятно, процессируется до получения активного белка. Исследование переходной экспрессии в системе протопласта ткани кукурузы, использующей ген B.t., оптимизированный относительно кукурузы и управляемый промотором -trpA, показало, что, когда ATG- в положении +114bp используется в качестве точки слияния, получают самые высокие уровни экспрессии. Использование любого из следующих двух ATC- в последовательности значительно снижает уровень экспрессии гена. ATG в положении +300bp давал некоторую активность, но на намного более низком уровне, чем +114 ATC, а ATG- в положении + 201bp не давал никакой активности.

Хотя ряд рамок, подобных рамкам Хогнесса, расположен слева от сайта инициации транскрипции на +1bp, ТАТААТ в положении -132bp является наиболее похожим на растительный консенсус ТАТААА. См. Joshi, Nuc. Acids Res., 15:6643-6653 /1987/. Блок, подобный блоку-ССААТ был обнаружен в положении -231bp. Нуклеотидная последовательность, окружающая стартовый ATG /GCGACATGGC/, гомологична другим точкам инициации трансляции у кукурузы, как это описано у Messing et al., Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, Plenum Press ss. 21-227 /1983/, но отличается от последовательности, которую считают согласованной последовательностью в растениях /ANNATGGC/. См. Joshi, ссылка указана выше. Возможный сигнал добавления поли/А/ расположен у 3719bp /AATAAA/ на геномной последовательности, 52bp от конца кДНК. Указанная последовательность согласуется с известными последовательностями для кукурузы, как это описано у Dean et al., Nuc. Acids Res., 14:2229-2240 /1986/ и расположена на 346bp ниже от конца трансляции белка. у Dean et al., Nuc. Acids Res., 14:2229-2240 /1986/. 3'- нетранслированная последовательность кДНК заканчивается у 3775bp на геномной последовательности.

Фиг.8 показывает саузерн-блот геномной ДНК кукурузы линии ДНК с приблизительным количеством копий гена, реконструированных с использованием кДНК 8 - 2 сердцевинного гена. По-видимому, из переваров рестрикции и реконструкции получают 1 - 2 копий гена, присутствующего в гаплоидном геноме. По-видимому, нет других генов с более низкими уровнями гомологии с указанным геном. Поэтому, он является представителем семейства с одним или малым числом генов в кукурузе.

Пример 18. Защита от РНКазы.

Структуру 5' - конца мРНК определяли, используя защиту от РНКазы. Защиту от РНКазы осуществляли, используя зонд, представляющий собой промежуток из 385bp от +2bp до +387bp. Этот участок из геномного клона помещали в вектор транскрипции РНК рGEM-5Zf/+ и формировали зонд РНК, меченый 32P, используя полимеразу SP6. Зонд и добавочные основания из множественного сайта клонирования продуцируют транскрипт из 461 нуклеотида (nt). Зонд гибридизовали с общей РНК сердцевины, а затем переваривали смесью РНКазы А и Т1 и анализировали защищенные фрагменты на денатурирующих полиакриламидных гелях. Анализ гелей показывает защищенный фрагмент из приблизительно 355nt и другой фрагмент из приблизительно 160nt. См. фиг.29В.

Тот факт, что расширение праймера, использующего праймер /№73/ в позиции +80bp, продуцирует продукт с длиной 90NT, свидетельствует о том, что 5' -конец расположен в позиции +1bp. Расширение праймера из поаймеоа, находящегося на этом участке, продуцирует продукт, так что можно было бы ожидать, что это также обнаруживается с помощью анализа защиты от РНКазы. Указанный праймер расположен в 5' области зонда предохранения от РНКаз. Клон кДНК содержит последовательности, присутствующие на 3' -конце зонда предохранения от РНКазы, и, следовательно, как ожидалось, они были защищены в этой пробе. Поскольку на геле имеется только одна полоса, которую можно было бы отнести за счет обеих этих последовательностей, мы уверены, что защищенный фрагмент фактически является большей полосой и что меньшая одна полоса является артефактом. Если бы в этой области не было интрона, в зонде присутствовали бы фрагменты из обоих концов и, следовательно, были бы определены на геле. Из двух видимых полос одна, по-видимому, представляет собой всю 5 область, поэтому мы не верим, что в этой области расположен интрон.

Пример 19. Комплементация мутанта TrpA E.coli сердцевинной кДНК 8 - 2.

CGSC штамм 5531 штамма E. coli, полученный из Центра генетических штаммов E.coli Валийского университета /по классификации О.Н.-Smith Lab №M5004/ с хромосомными маркерами glnA3, TrpA9825,1-, IN (rrnD-rrnE), thi-I, описанный Mayer et al., Mol Gen. Gentet., 137:131-142 /1975/, трансформировали сердцевинной /TrpA/ кДНК 8 - 2 либо блюскрипт-плазмидой /стратаген/, как это описано у Sambrook et al., см. выше. Трансформанты, содержащие TrpA кДНК 8 - 2 обладали способностью расти без наличия триптофана на минимальной среде, тогда как трансформанты блюскрипт-плазмиды /стратаген/ или с нетрансформированной регуляцией не были способны расти без триптофана. Клетки, трансформированные кукурузным TrpA геном росли очень медленно и колонии становились видимыми после семи дней роста при комнатной температуре. Все штаммы выращивали на минимальной среде M9 с добавлением 200мкг/мл глутамина, 0,01мкг/мл тиамина и с добавлением или без добавления 20мкг/мл триптофана. Все трансформанты были проверены на наличие соответствующей плазмиды путем анализа рестриктазы.

Колонии, выращенные в отсутствии трпктофана, содержали клон 8 - 2, содержащий кДНК условного кукурузного TrpA гена, как это подтверждено саузерн-гибридизацией /данные не показаны/. Указанные

результаты подтверждают вывод о том, что это кукурузный белок субъединицы А триптофан синтеза.

Пример 20. Экспрессия гена.

Исследовали паттерн экспрессии преимущественно-сердцевинного гена во всем растении. Также исследовали различные кукурузные генотипы на паттерны экспрессии этого гена. В качестве источника РНК для этих исследований использовали следующие ткани: верхнюю, срединную и нижнюю сердцевин, опорные корни, плюсну колоса, кочерыжку кукурузного початка в генотипе 5N984; верхнюю, срединную, нижнюю сердцевин, 10-дневные листья, 14-дневные опорные корни и сердцевину всего растения в генотипе 211Д и семена из генотипа 211Д, которые собирали еженедельно в течение одной-пяти недель после опыления.

Нижнюю сердцевину выделяли из стебля в пределах двух междуузлий, расположенных над опорными корнями; срединную сердцевину выделяли из последующих трех междуузлий; верхнюю сердцевину выделяли из последних двух междуузлий перед метелкой 60- и 70-дневных растений. У 39-дневных растений имелось только два междуузлия, а у 46-дневных растений - три междуузлия. Нозерн-блот анализ показал, что транскрипты, гибридизированные фондом, выделенным из сердцевинной кДНК, быстро аккумулируются в молодой сердцевине и в молодых листьях. По мере увеличения возраста растения и роста стебля наблюдается значительное уменьшение количества выявленного транскрипта. См. фиг.25А-Д. В РНК, выделенной из семени, общей РНК, либо поли А+ РНК, ни разу не получали информацию от этого гена. См. фиг.26. Транскрипт также был выявлен в корне, плюсне колоса и обертке, но не на таких высоких уровнях, которые были выявлены в тканях сердцевин и молодых листьев. См. фиг.25В, 25С. Определенная информация была выявлена к опорных корнях, но только на очень низком уровне. См. фиг.25Д. С помощью нозерн-блот анализа были исследованы шесть недифференцированных линий каллюса кукурузы, при этом ни в одном образце каллюса не была обнаружена экспрессия этого гена /данные не показаны/. Уровень экспрессии указанного гена является экстремально высоким, поскольку очень сильный сигнал из TrpA гена 8 - 2 в зонд мог быть обнаружен в сердцевине и листе менее, чем через два часа после экспозиции блота на пленку /фиг.25А/. Количество полученного РНК сравнимо с количеством РНК, выделенным из гена фосфоэнолпируват карбоксилазы кукурузы, описанного Hudspeth, et al., Plant Mol. Biology, 12:579-589 /1989/, который является другим высокоэкспрессивным геном кукурузы. Вышеуказанная работа приводится в данном описании в качестве ссылки.

Характер экспрессии данного гена не является постоянным во времени. Экспрессия очень высока в нижней и срединной сердцевинах растения в возрасте, меньше 60 дней, и быстро уменьшается у вершины растения. По мере того, как растение достигает зрелости, например после 70 дней роста, экспрессия падает до необнаруживаемых уровней, за исключением нижней сердцевин и плюсны колоса. Аккумулирование транскрипта в молодом листе почти также высоко, как и в нижней сердцевине, но экспрессия быстро уменьшается и не обнаруживается в листьях через 40 дней после их появления. Было обнаружено, что экспрессия в листе различна в зависимости от времени года, когда он растет.

Нижеприведенные примеры 21 - 39 касается анализа выделения, характеристики и экспрессии специфически-пыльцевого промотора согласно настоящему изобретению.

Пример 21. Выращивание кукурузы.

Кукурузу /инбредная линия Фанка 211ДZea mays/ выращивали из семени в смеси вермикулита и песка в теплице в режиме 16-часового светлого и 8-часового темного времени.

Пример 22. Выделение общепыльцевого белка.

Спелую пыльцу выделяли из кукурузы в период максимального пыльцеобразования. С целью удаления инородных примесей её просеивали, затем замораживали в жидком азоте, 3 - 4мл замороженной пыльцы измельчали в ступке и расталкивали с равным объёмом 75 - 150мкг стеклянных шариков. 40мл диспергирующего буфера /2мМ ЭДТК, 5мМ ДТТ, 0,1% SDS, 100мМ Hepes pH8/ добавляли к указанной смеси, которую вновь измельчали. Стеклянные шарики и неповрежденные пыльцевые зерна осаждали путем низкоскоростного центрифугирования, после чего смесь очищали центрифугированием при ускорении 10000л, в течение 15 минут. Белок осаждали из надоса-дочной жидкости путем добавления ацетона до 90%.

Пример 23. Выделение белка пыльцевой экины.

Белок экины выделяли из спелой пыльцы кукурузы линий 211Д, как это описано у Matousek и Turpy, J., Plant Physiology 119:169-178/1985/.

Пример 24. Выделение белка листа.

Молодые листья /выросшие приблизительно на 60%/ отрывали от кукурузы и удаляли средние жилки. Полны? белок выделяли также, как и у пыльцы, за исключением того, что материал не замораживали, а измельчение осуществляли в размельчителе Уоринга без стеклянных шариков.

Пример 25. Выделение белка зерна.

Колосья с полностью разлитыми, но еще влажными зернами отрывали от растения и с помощью скальпеля удаляли из них зерна. Полный белок выделяли также как и у листьев.

Пример 26. Гель-электрофорез белков кукурузы.

Белки пыльцы, листьев и зерен сепарировали на SDS полиакриламидных гелях, как это описано у Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Нью-Йорк /1989/. После окрашивания с помощью кумасси голубого красителя проводили сравнение белковых полосок из пыльцы, листьев и зерен и определяли широко распространённые белки с размерами 10кД, 13кД, 20кД, 45кД, 55кД и 57кД, наиболее характерными для пыльцы.

Идентификация клонов специфически-пыльцевой кДНК.

Пример 27. Определение частичной последовательности специфически-пыльцевых белков.

Белковые полосы, определенные как специфически-пыльцевые очищали электроблситированием из геля полиакриламида на PVDF мембрану /Matsudalra, P., J, Biol. Chem. 261:10035-10038 /1987// или ЖХВР с обращенной фазой N-терминальную последовательность очищенных белков определяли с помощью автоматизированной деградаций по Эдману на газо-фазном секвенаторе 470A фирмы Appdled Blosystems.

Фенилтиогидантоиновые /PTH/ аминокислоты идентифицировали, используя анализатор PTH 120A Appdled Blosystems. Для получения внутренней последовательности белки перепаривали эндопротеиназой Lys-C /Boehringer Mannheim/ в 0,1M Tris-HCl, pH8,5 в течение 24 часов при комнатной температуре, используя фермент/субстрат в соотношении 1 : 10. Полученные в результате белки выделяли с помощью ЖХВР, используя колонку Aquaroge C-8, элюированную линейным ацетонитрил/изопропаноловым /в соотношении 1 : 1/ градиентом /от 0 до 60%/ в 0,1% TFA+ Последовательность выделенных Lys-C пептидов определяли, как это было описано выше. Для специфически пыльцевого белка 13кД были определены следующие последовательности:

N-концевая: TTPLTFQVGKGSKPGHILTPNVATI
LysC 61: KPGHILTPNVATISDVVIK
LysC 54: SGGTRIADDVIPADFK
LysC 49: EHGGDDFSFTLK
LysC 43: EGPTGTWLTDTK

Пример 28. Синтез олигонуклеотидных зондов для специфически пыльцевых кДНК.

Были отселектированы области пептидной последовательности в белке 13кД с низкой избыточностью кодона и с помощью синтезатора Appdled Blosystems 380A синтезированы подходящие олигонуклеотидные зонды для генов, кодирующих указанные области. Были синтезированы следующие олигонуклеотиды:

Олиго № 51 5'- AA ATC ATC ACC ACC ATG TTC -3'
G G G T C
C
Олиго № 58 5'- CC TTT ACC CAC TTG AAA -3'
C G C G
T
C

где колонки нуклеотидов представляют основания, которые случайно образом вводили в равных пропорциях на указанную позицию в олиго. Олиго № 51 кодирует аминокислотную последовательность EHGGDDF, выявленную в пептиде LysC 49, а олиго № 58 кодирует аминокислотную последовательность FQVGKG, выявленную на N-конце пептида. Использование указанных смешанных олигонуклеотидов для скринирования библиотеки кДНК специфически-пыльцевого гена описано ниже.

Пример 29. Конструирование библиотеки кукурузной пыльцевой кДНК.

Полную кукурузную РНК выделяли из спелой пыльцы кукурузы линии 211Д так, как это описано у Gllsen et al., Bicchemistry 13:2633-2637 /1974/. Из полной РНК очисткой выделяли поли А+мРНК, как это описано у Sambrook et al. Используя указанную мРНК, приготавливали кДНК с помощью набора для синтеза кДНК, который закупали у фирмы Promega, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. К кДНК добавляли линкеры EcoRI, после чего осуществляли её лигирование в ветви лямбда Зар клонирующего вектора, закупленного у фирмы Stratagen, используя инструкции, предоставляемые поставщиком. Продукт лигирования упаковывали в лямбда пакующий экстракт, также закупленный у фирмы Stratagen, и использовали для заражения клеток E. coot B34.

Пример 30. Выделение клонов специфически-пыльцевых кДНК.

Библиотеку кДНК пыльцы кукурузы зондировали, используя синтетические полинуклеотидные зонды, характерные для гена белка 13кД, как это описано Sambrook et al. Другими словами, приблизительно 100000 стерильных пятен библиотеки пыльцевой кДНК высевали и помещали на нитроцеллюлозные фильтры. Фильтры зондировали с помощью олигонуклеотидов № 51 и № 58, которые метили на конце 32Р, используя полинуклеотидную киназу. Зонды гибридизировали на фильтрах при низкой жесткости /50°C в 1М NaCl, 10% декстран сульфата, 0,5% SDS/, промывали 30 минут при комнатной температуре, а затем 30 минут при температуре 45°C в 6х SSC, 0,1% SDS и экспонировали на рентгеновскую пленку для идентификации позитивных клонов. Условные клоны очищали посредством 4-кратной гибридизации пятен. Выделяли три типа клонов кДНК. Тип I содержал фрагменты EcoRI с размерами 0,2kb и 1,8kb. Тип II содержал фрагменты EcoRI с размерами 0,6kb, 0,5kb и 1,0kb, а тип III содержал фрагмент EcoRI с размером 2,3kb.

Пример 31. Характеризация клонов специфически-пыльцевых кДНК.

Фрагменты EcoRI клон кДНК типа II субклонировали в плазмидный рблоскрипт-вектор SK+, закупленный у фирмы Stratagen См. фиг.30. Фрагмент с размером 0,6kb рблоскрипта получил название II-6, фрагмент с размером 0,5kb получил название II-5 /позже переименованный в pC1B3169/ и фрагмент в рблоскрипте с размером 1,0kb получил название II-1,0 /позже переименованный pC1B3168/. Как будет описано ниже, фрагменты с размером 0,5kb и 1,0kb кодируют кукурузный специфически-пыльцевой ген СДРК. РНК из пыльника, пыльцы, листьев, корня и шелка денатурировали с глиоксалем, подвергали электрофорезу на 1%

геле агарозы, трансформировали в нитроцеллюлозу и зондировали по отдельности с тремя/фрагментами EcoRI, которые были мечены 32P с помощью случайного расширения прайморов, как это описано Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press:New York /1989/. Блоты экспонировали на рентгеновскую плёнку и мРНК-полоску с размером, приблизительно равным 1,5kb, идентифицировали с помощью фрагментного зонда с размером 0,6kb, в то время, как фрагменты с размерами 0,5 и 1,0kb гибридизовали с мРНК с размером, приблизительно равным 2,0kb. Во всех случаях гибридизацию наблюдали только на линии пыльцевой РНК, за исключением того, что фрагмент с размером 0,6kb показал слабый сигнал в другой мРНК. Из этих данных можно сделать вывод о том, что начальный клон кДНК представлял собой слияние молекул кДНК, выделенных из двух различных мРНК. Фрагмент с размером 0,6kb являлся частью кДИК специфически-пыльцевой мРНК с размером 1,5kb при этом указанная мРНК кодирует пептиды LysC 49 и N-конец. Фрагменты с размером 1,0 и 0,5kb содержат частичную кДНК специфически-пыльцевой мРНК с размером 2,0kb, не относящейся к пептидам и олигомерным зондам, используемым для зондов. Этот вывод был подтвержден секвенированием фрагментов, используя способ терминирования дидеокси цепи, описанный у Sambrook et al. Последовательность кДНК показана на фиг.31.

Пример 32. Определение специфичности экспрессии мРНК.

Для определения того, присутствовала ли РНК с размером 2,0kb, представленная клоном кДНК pC1B3169 и pC1B3168, только в пыльце, выделяли полную РНК из корней, листьев, пыльцы, пыльников и шелка кукурузы линии 211Д. РНК денатурировали с глиоксолью, подвергали электрофорезу на 1% геле агарозы, трансформировали в нитроцеллюлозу и зондировали вставкой EcoRI, меченой 32P из плазмиды pC1B3168 или pC1B3169, используя стандартные методики, описанные у Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press:New York /1989/. Экспонирование этого блота на фотопленку показало, что ген, представленный этими двумя клоном, является транскрипционно активным только в пыльце /фиг.32/.

Идентификация специфически-пыльцевого промотора.

Пример 33. Конструирование библиотеки геномной ДНК кукурузы.

Геномная ДНК из молодых побегов кукурузы линии 211Д была выделена способом, описанным Shure et al. Cell 35:225-233 /1983/. ДНК поставлялась фирмой Stratagene, где библиотеку геномной ДНК конструировали путем клонирования частично переваренной с помощью Sau3AI ДНК в клонирующий вектор Lambda Dash, фирмы Strategene.

Пример 34. Гибридизация блота геномной ДНК для определения количества копий гена.

Геномную ДНК из кукурузы линии 211Д переваривали рядом рестриктаз, каждый перевар подвергали электрофорезу на геле агарозы, трансформировали в нитроцеллюлозу и зондировали вставкой EcoRI, меченой 32P из плазмиды pC1B3168 /фрагмент с размером 1,0kb/, плазмиды pC1B3169 /фрагмент с размером 0,5kb/ или клона II-.6, используя стандартные методики, описанные Sambrook et al., С помощью зонда II-.6 в большинстве переваров было обнаружено более 10 полосок, указывающих на то, что эта ДНК выделена из большого многогенного семейства. Зондирование с помощью фрагмента размером 1,0kb выявило от 3 до 6 полосок, а зондирование с фрагментом размером 0,5kb выявило только от 1 до 3 полосок, которые представляли собой субпопуляцию полосок, обнаруженную фрагментом размером 1,0kb. Благодаря меньшему размеру семейства генов, обнаруженного фрагментами размером 1,0 и 0,5kb, было решено попытаться выделить соответствующий геномный клон.

Пример 35. Выделение специфически-пыльцевого геномного клона.

Геномную библиотеку кукурузы линии 211Д от фирмы Strategene скринировали путем зондирования отпечатков с вставками, мечеными 32P, из плазмид pC1B3168 /фрагмент размером 1,0kb/ и pC1B3169 /фрагмент с размером 0,5kb/, используя стандартные методики, описанные в инструкции фирмы Strategene, прилагаемые к библиотеке. Используя указанную методику, выделяли лямбда-клон MG14 и гибридизовали его с обоими зондами. Фрагмент BamHI с размером 9,0kb клона MG14, который также гибридизовали с обоими зондами, субклонировали в сайт BamHI рбюскрипта SK+ для создания плазмиды pC1B379. 1800bp плазмиды pC1B379 на участке, соответствующем последовательности кДНК, было секвенировано, как описано выше. Сравнение последовательностей кДНК и геномной показало идентичность, равную только 91%. Вставка pC1B379 представляет собой родственный специфически-пыльцевой ген.

Вторую геномную библиотеку кукурузы линии 211Д конструировали в лямбда-векторе GEM-11, закупленном у фирмы Promega, используя методики, указанные в инструкции фирмы. Скринирование этой неамплифицированной библиотеки, как было указано выше, дало клон GEMII-I, который гибридизовали с обоими зондами с размерами 0,5 и 1,0kb. Фрагмент HindIII с размером 20kb клона GEMII-I, который также гибридизовали с обоими зондами, субклонировали в сайт HindIII рбюскрипта SK+ для получения плазмиды pC1B3166. Определяли последовательность ДНК с размером 4,1kb плазмиды pC1B3166 /фиг.36/ и после выявления шести интронов в геномном клоне было установлено, что она имеет 100% идентичность с последовательностью кДНК pC1B3168 и pC1B3169. Сравнение последовательности плазмиды pC1B3166 с базой данных Генбанка/EMBL показало, что 5' участок через 3-ий экзон был на 34,6% идентичен киназе II калмодулин-зависимого белка крысы на аминокислотном уровне /фиг.33/, тогда как четвертый - седьмой экзоны были идентичны кальмодулину крысы на 39,4%, см. фиг.34. Ни одна другая киназа не была описана при этом не был известен белок, объединяющий домены кальмодулина и киназы. Впоследствии, Harper et al., Science 252:951-954 /1991/ описали последовательность кДНК аналогичного белка из сои, хотя этот ген не является специфически-пыльцевым при экспрессии. Сравнение киназы кальций-зависимого белка сои /СДРК/ и СДРК пыльцы кукурузы показывает 38% идентичность на аминокислотном уровне. См. фиг.35.

Пример 36. Идентификация транскрипционного иницирующего сайта промотора с помощью расширения праймера.

В качестве праймера был синтезирован олигонуклеотид PE5I со следующей последовательностью:

5' -TGGCCCATGGCTGCGGCCGGAACGAGTGC GGC -3'

Анализ расширения праймера проводили на поли A+ пыльцевой мРНК, как это описано у Metraux et al., PNAS USA 86:896-890 /1989/. Сайт инициации транскрипции находился, как это было определено, между основаниями 1415 и 1425 на частичной последовательности плазмиды pCIB3166, показанной на фиг.36.

Исследование функции промотора в трансгенных растениях.

Пример 37. Конструирование векторов промотора для трансформации растений.

Для демонстрации того, что промотор пыльцевой СДПК может вызывать экспрессию связанного гена в трансгенные растения, слияние гена промотора пыльцевой СДПК с бета-глюкуронидазным геном E.coli обеспечивали следующим образом. Фрагмент BamHI с размером 10kb из лямбда GEMII-I, содержащий первый экзон и часть первого интрона гона пыльцевой СДПК, а также фрагмент размером 9kb выше гена, субклонировали в сайт BamHI рблоскрипта SK+ для образования плазмиды pCIB3167. Фрагмент BamHI-HindIII с размером 2,3kb из плазмиды pCIB3167 субклонировали в сайты BamHI и HindIII рблоскрипта SK+ для образования плазмиды pSK105. Плазмиду pSK105 переваривали с помощью Aval и HindIII и на геле агарозы выделяли фрагмент HindIII-Aval с размером 1,75kb. Реакцию PCR проводили в стандартных условиях, как это описано у Sambrook et al, используя неповрежденную плазмиду pSK105 в качестве матрицы, и следующие праймеры:

№ 42: 5' - AGCGGTGACCTGCAGGCATGCGATCTGCACCTCCCGCCG-3'

№ 43: 5' -ATGGGCAAGGAGCTCGGG-3'

Продукты реакции PCR переваривали с помощью Aval и SII и полученный фрагмент выделяли на геле агарозы. Рблоскрипт SK+ переваривали с помощью HindIII и Aval. Для образования плазмиды pSK110 осуществляли трехходовое лигирование фрагмента HindIII-Aval с размером 1,75kb .фрагмента Aval-Sall, выделенного при реакции PCR, и рблоскрипт-вектора с концами HindIII n Sall.

Слияние фрагмента промотора в pSK110 с геном бета-глюкоронидазы /GMS/ осуществляли путём переваривания плазмиды pSK110 с помощью HindIII и Sall, выделяя фрагмент с размером 1,9kb на геле агарозы и лигируя его в сайты Hind и Sall плазмиды pC1B3054 для образования плазмиды pK12, при этом плазида, выделенная из pUC19 содержала ген GUS, за которым следовал растительный интрон из гена PEPC кукурузы и полиА сигнал из вируса мозаики цытронной капусты. Указанное промоторное слияние в растениях было пассивным, возможно, из-за отсутствия внерамочных ATG кодонов в лидерной последовательности, предшествующей GUS гену ATG.

Функциональное слияние промотора осуществляли путем переваривания плазмиды pKL2 с XbaI и Sall с целью удаления соединения предыдущего слияния. Новое место слияния продуцировали с помощью реакции PCR, используя в качестве матрицы плазмиды pSK105 и следующие праймеры:

№ K50: 5' -CCCTTCAAAATCTAGAAACCT-3'

№ K49: 5' -TAATGTCGACGAACGGCGAGAGATGGA-3'

Продукт PCR переваривали с помощью XbaI и Sall и очищали на геле агарозы. Очищенный Фрагмент лигировали в сайты XbaI и Sall плазмиды pKL2 для образования плазмиды pCIB3171. Указанная плазида содержит функциональное слияние промотора СДПК и GUS, которое направляет экспрессию гена GUS исключительно в пыльцу.

Для образования вектора, содержащего слияние промотора пыльцевой СДПК-GUS, подходящее для использования в растениях, трансформированных с помощью Agrobacterium tumefaciens, ген слияния выделяли из плазмиды pCIB3171 с помощью переваривания HindIII и Sall. Полученный фрагмент лигировали с сайтами HindIII и Sall плазмиды pB1101 /закупленной у фирмы Clontech/ для образования плазмиды pC1B3175.

Пример 38. Продуцирование трансгенных растений.

Плазмиду pC1B3175 трансформировали в Agrobacterium tumefaciens, содержащий плазмиду помощник pC1B542 и полученную культуру использовали для трансформации дисков листьев из культур, выделенных из верхушки побега табака, как это описано у /Horsch et al., Science 227:1229-1231 /1985/, за исключением того, что покровные культуры не включались, а селекцию проводили на 100мг/л канамицина. Трансгенные растения были регенерированы и проверены на присутствие трансгена с помощью реакции PCR.

Пример 39. Анализ экспрессии гена.

Пыльцу из первичных трансформантов и их потомства гистохимически анализировали на экспрессию гена GUS, как это описано у Guerrero et al., Mol. Gen. Genet. 224:161-168 /1990/. В нижеприведенной таблице показан процент пыльцевых зерен, экспрессирующих ген GUS, определённый с помощью голубого окрашивания в буфере X-gluc:

Номер растения % пыльцы, окрашенной в голубой цвет

PP1-51	28%
PP1-54	54%
PP1-55	нет
PP1-61	очень малый
PP1-63	51%
PP1-67	15%
PP1-80	10%

Первичные трансформанты, в которые был введен единичный промотор пыльцевой СДПК - ген GUS, продуцируют максимум 50% позитивной пыльцы GUS вследствие сегрегации единичного гена.

С целью демонстрации экспрессии промотора пыльцевой СДПК были проведены флуориметрические анализы GUS пыльцы, стебля, корня, листьев и пестика отобранных растений. Анализы выполнялись по методике, описанной у Jefferson, Plant Mol. Biol. 14:995-1006 /1990/ и величины активности GUS выражали в нмоль MU/мкг белка/мин.

Номер растения	Ткань	Активность GUS	Активность нетрансформированного растения	Активность чистого GUS
10	PP1-61 стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
	корень	0,15	0,10	0,05
	пестик	0,02	0,01	0,01
15	пыльца	0,24	0,02	0,22
	PP1-54 стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
	корень	0,13	0,1	0,03
20	пестик	0,01	0,01	0
	пыльца	0,60	0,02	0,58
	PP1-63 стебель	0,01	0,02	0
	лист	0	0	0
25	корень	0,07	0,1	0
	пестик	0,01	0,01	0
	пыльца	0,57	0,02	0,55

Примеры 40 - 50 рассматривают приготовление преимущественно химерных конструкций, т.е. молекул рекомбинантной ДНК, содержащих постоянные, преимущественно-тканевые или специфически-тканевые промоторы, оперативно связанные с геном B.t, вставку указанных промоторов в векторы, продуцирование трансгенных растений, содержащих векторы, и анализ уровней экспрессии белков B.t. трансгенных растений.

Пример 40. Конструирование трансформирующих векторов Bt, оптимизированных относительно кукурузы.

Для доказательства эффективности синтетического гена Bt cryIA/v/ в кукурузе PEP и специфические сердцевинные промоторы сливали с синтетическим геном cryIA/v/ Bt, используя реакцию PCR. Олигомерами, предназначенными для слияний при PCR, являлись:

/PEP/

KE99A28 = 5' -TGCGGTTACC GCCGATCACATG-3'

KE97A28 = 5' -GCGGTACCGC GTCCACGCGG ATCCCGCCGGC GGGAAGCTAAG-3'

/СЕРДЦЕВИНА/

KE100A28 = 5'- CTCGTGACCG GCAACA-3'

KE98A28 = 5'-GCGGTACCGC GTTAACGCGG ATCCTGTCCG ACACCGGAC-3'

KE104A28 = 5'-GATGTCGTCG ACCGCAACAC-3'

KE103A28 = 5'-GCGGTACCGC GGATCCTGTC CGACACCGGA CGGCT-3'

Праймеры PCF конструировали для замещения сайтов Nco 1 в 5' область нетранслированного лидера каждого из вышеуказанных специфически-тканевых генов /содержащих сайты иницирования трансляции ATG-/ сайтами BamHI для облегчения клонирования синтетического гена cryIA/v/ в указанный сайт BamHI.

Последующая конструкция векторов, содержащих специфически-тканевые промоторы, слитые с синтетическим геном cryIA/v/, и также содержащих маркерный ген 35S:PAT:35S, включают несколько промежуточных конструкций.

1. pC1B4406 /35S:синтетический-cryIA/v/ :pepC встроенная последовательность № 9:35S/

pC1B4406 содержит BamHI/Cla I синтетический ген cryIA/v/ с размером 2kb, слитый с промотором CaMV 35S/Rothstein, et al. Gene 53:153-161 /1987//. Ген также содержит интрон №6, выделенный, из кукурузного гена PEP карбоксилазы /встроенная последовательность №9 -lvs№9/ в 3' нетранслированной области гена, который использует CAMV 3'-конец. /PNAS USA 83:2884-2888 /1986/, Hudspeth et al., Plant Molecular Biology, 12:579-589 /1989//.

pC1B4406 лигировали и трансформировали в штамм "SURE" клеток E.coli /Stratagene, la Jolla, CA/, как описано выше. Была обнаружена одна мутация в гене cryIA/v/ плазмиды pC1B4406 в аминокислоте №436, что приводило к требуемому изменению Phe на Leu. Плазмида pC1B4406 является полностью активной против Европейского зернового точильщика, что было обнаружено при исследованиях биопроб насекомых, и продуцирует белок CryIA/v/ ожидаемого размера, как это определено вестерн-блот анализом.

2. pC1B4407 /35S:синтетический- cryIA/v/:pepC lvs №9;35S+35S:PAT:35S/

pC1B4407 изготавливали из HindIII/Eco RI фрагмента с размером, приблизительно равным 4kb, содержащего ген 35S:PAT:35S, и гена HindIII/Eco RI 35S:синтетический-cryIA/v/:35S с размером 3,1kb из плазмиды pC1B4406. pC1B4407 лигировали и трансформировали в штаммы "SURE", ДН5альфа и HB101 E.coli, используя стандартные методики /Sambrook et al./.. Синтетический ген cryIA/v/ имел те же свойства, что и его предшественник pC134406.

3. pC1B4416 /35S:синтетический-cryIA/в/:pepC lvs№9:35S + 35S:PAT:35S + 35S:Adh интрон:GUS:35S./
pC1B4407 резали Eco RI и обрабатывали щелочной фосфатазой из кишечника телят /CIP/ при стандартных условиях /Sambrook et al./ для продуцирования фрагмента размером приблизительно 7,2kb), который лигировали с фрагментом Eco RI 35S:Adh/GUS:35S с размером 3,4kb для продуцирования pC1B4416. Лигирование и трансформации в клетки "SURE" осуществлялись, как описано выше. Синтетический ген cryIA/в/ в pC1B4416 имел те же свойства, что и ген в pC1B4406.

4. pC1B4418 /35S:синтетический-cryIA/в/:pepC lvs №9:35S/

pC1B4406 перепаривали с помощью Apa I и BamHI и обрабатывали CIP. pC1B4406 переваривали с помощью BamHI и Nsp I. PBS123 №13 переваривали с помощью Nsp I и Apa I. Для образования pC1B4418 осуществляли трёхходовое лигирование, содержащее фрагмент Apa I/ BamHI с размером 4,3kb из pC1B4406, фрагмент BamHI/Nsp I с размером 1,3kb из pC1B4406 и фрагмент Nsp I/Apa I с размером 170kb из pBS123 №13. Штаммом-хозяином E. coli для pC1B4418 является HB101.

5. pC1B4419 /35S:синтетический-cryIA/в/:pepC lvs№9:35S + 35S:PAT:35S + 35S:Adh интрон:GUS:35S./

pC1B4416 и pC1B4418 переваривали с помощью Bst E II и EcoNI и фрагменты pC1B4406 обрабатывали CIP. Фрагмент с размером 9,1kb лигировали для образования pC1B4419 с фрагментом с размером 1,4kb из pC1B4418. pC1B4419, трансформированная в соответствующие HB101 клетки E.coli, показала полную активность в биопробах насекомых против Европейского зернового точильщика.

6. pC1B4420 /сердцевина:синтетический-cryIA/в/:PEPC lvs №9:35S + 35S:PAT:35S/

Промежуточными конструкциями при получении pC1B4420 являлись pBtIn1, pBtIn2, p4420A и pBtIn3. pBtIn1 /сердцевинный промотор: вторая половина синтетического гена Bt + 35S:PAT:35S/ изготавливали путем лигирования фрагмента сердцевинного промотора Xba I //co I с размером 2,1^биз плазмидной сердцевины /3-1/ с фрагментом Xba I/Nsa I с размером 5,2kb из pC1B4407. pBtIn2 является промежуточной конструкцией, содержащей сердцевинный промотор, модифицированный фрагментом реакции PCR с размером 210bp, изготовленный с использованием праймеров KE100A28 и KE98A28, приведенных выше.

Реакционная смесь PCR содержит приблизительно 100нг фрагмента сердцевинного промотора BamHI/Nco I с размером 2,1kb со 100 пмольями каждого олигомера, 200нМ, каждого dNTP, однократный буфер /Cetus/ и 2,5 единицы термоустойчивой полимеразы. Поскольку температура плавления ДНК /Тм/ является относительно низкой /между 40° и 50°С/, реакции PCR выполняли при следующих параметрах:

цикл денатурации: 94°С в течение 1 минуты;

цикл гибридизации: 37°С в течение 1 минуты

цикл расширения: 72°С в течение 45 секунд /с прибавлением 3 секунд в каждом цикле/;

количество циклов: 25

Пробы PCR, обрабатывали протеиназой K, как это описано выше, перед разрезанием с помощью Sal I/Kpn I с последующей экстракцией фенол/ хлороформа и осаждением этанолом, как это описано выше. Фрагмент с размером 210bp очищали на 2% Nusieve геле и экстрагировали из гели, используя фильтровальные установки ультра тонкой очистки. Фрагмент Sal I/Kpn I с размером 210bp лигировали с фрагментом Sal I/Kpn I с размером 4,9kb из сердцевины /3 - 1/ для получения pBtIn 2. p4420A /сердцевина:синтетический-M:Пер интрон:35S + 35S:PAT:35S/ изготавливали трёхходовым лигированием, содержащим фрагмент NsiI/BamHI с размером 700bp из pBtIn2, фрагмент Bam HI/Bst E II с размером 1,8kb из pC1B4418 и фрагмент Bst E II/NsiI с размером 5,9kb из pBtIn1. После изготовления p4420A в pBtIn2 были обнаружены три мутации. Второй фрагмент PCR изготавливали с целью модификации сайта Nco I в лидере сердцевины, используя праймеры KE104A28 и KE103A28 при значении Тм, равном приблизительно 65°С. Смесь реакции PCR идентична смеси, подведенной выше, с добавлением глицерина до 20% для уменьшения мутаций в областях с избытком G+C /Henry et al., Plant Molecular Biology Reporter 9/2/:139-144, 1991/. Параметры реакции PCR следующие:

Файл 1: 94°С: 3 минуты, 1 цикл

Файл 2: 60°С: 1 минута, 94°С: 1 минута. 25 циклов

Файл 3: 72°С: 5 минут, 1 цикл

Пробы PCR обрабатывали, как описано выше, и разрезали с помощью эндонуклеаз рестрикции Sal I и Kpn I. Фрагмент PCR /глицерин в пробе /Sal I/Kpn I с размером 210bp лигировали с фрагментом Sal I/Kpn I с размером 4,9kb из сердцевины плазмиды /3 - 1/ с целью получения pBtIn3. Данные о последовательности на pBtIn3-GN#1 показывают, что фрагмент, выработанный PCR, является правильным.

pBtIn3-GN#1 использовали для получения pC1B4420 /также называемой p4420B "GN#6"/. pC1B4420 конструировали с помощью трёхходового лигирования, используя фрагмент Nsi I/BamHI с размером 700bp из pBtIn-GN#1, фрагмент BamHI/Bst E II с размером 1,8kb из pC1B4418 и фрагмент Bst E II/Nsi I с размером 5,9kb из pBtIn 1. pC1B4420 использовали в опытах с протопластом мезофила, при этом была доказана полная активность синтетического гена cryIA/в/ против Европейского зернового точильщика.

7. pC1B4413 /PEPC: синтетически-Bt /Phe мутация/:PEPC интрон: 35S./

Фрагмент слияния вырабатывали с помощью PCR, используя праймеры KH99A28 и KE97A28 с матрицей Hind III/Sal I с размером 2,3 из pGUS4.5. Смесь PCR имеет ту же концентрацию праймеров, матрицы, dNTP, солей и термоустойчивой полимеразы, как было описано выше. Реакция PCR имела следующие параметры:

цикл денатурации: 94°С в течение 1 минуты

цикл гибридизации: 55°С в течение 1 минуты цикл расширения: 72°С в течение 45 секунд /с прибавлением

трёх секунд в каждом цикле/

количество циклов: 30

Затем пообсы POR обрабатывали протеиназой К с последующим экстрагированием фенол/хлороформом и осаждением этанолом, как это описано ниже, перед разрезанием с помощью эндонуклеаз рестрикции BamHI и Bst E II.

pC1B441P получали путём трёхходового лигирования, используя фрагмент BamHI/Bst E II с размером 210bp, фрагмент BamHI/Hind III с размером 4,7kb из pC1B4406 и фрагмент Hind III/Bst E II с размером 2,2kb из pGUS4.5.

8. pC1B4421 /PEPC:синтетический- cryIA/v/PEPC интрон:35S./

pC1B4421 изготавливали для замещения синтетического гена cryIA/v/, содержащего мутацию Phe в pC1B4413, синтетическим геном cryIA/v/ из pC1B4419. pC1B4421 получали путём лигирования фрагмента BamHI/Sac I с размером 5,2kb из фрагмента pC1B4413 с фрагментом BamHI/Sac I с размером 1,9kb из pC1B4419.

9. pC1B4423 /PEPC:синтетический-cryIA/v/:PepC интрон:35S и 35S:PAT:35S/

Фрагмент PEPC промотора BamHI/Hind III с размером 2,4kb из pC1B4421 лигировали с фрагментом BamHI/Hind III с размером 6,2kb из pC1B4420 для получения pC1B4423. Сайт Hind III удаляли экзонуклеазами при клонировании pC1B4423. pC1B4423 содержит синтетический ген cryIA/v/, управляемый PEPC промотором, и PAT ген, управляемый промотором 35s.

10. Синтетический ген cryIA/v/ в штаммах Agrobacterium:

Штаммы Agrobacterium, полученные с помощью синтетического гена cryIA/v/, обеспечивают перенос этого гена в ряде двудольных растений. Agrobacterium вектор pC1B4417 содержит фрагмент Hind III/ Eco RI 35S:синтетический-CryIA/v/:PepC:ivs:35S с размером 3,3kb из pC1B4406 /Phe мутация/, лигированного с фрагментом Hind III/Eco RI из pB1101 /Clontech/. Используя электронрацию, pC1B4417 перенесли в штамм A.tumefaciens LBA4404 /Die –thard et al., Nucleic Acids Research, Vol17:№16:6747 1989./.

200нг pC1B4417 и 40мкл размороженных подходящих клеток LBA4404 подвергали электрототации предварительно охлаждённых кювет для электропорации размером 0,2см. /Bio-Rad Laboratories Ltd./.

Используя датчик импульсов Gene Pulser-TM совместно с блоком регулирования импульсов /Bio-Rad/, прикладывали электрический импульс с напряжением 2,5кВ при ёмкости, равной 25мкФ. После прикладывания импульса клетки сразу же переносили в 1мл среды УЕВ и встряхивали в течение трёх часов при температуре 27°C перед их высеванием на чашки, содержащие АВМn:Км50. После инкубирования при температуре 28°C в течение приблизительно 60 часов колонии селектировали для минискрининга с целью проведения рестрикционного анализа. Конечный штамм Agrobacterium назвали pC134417:1BA4404.

Пример 41: ферментный иммуносорбентный анализ /ELISA/ трансформированных кукурузных протопластов.

Наличие токсического белка cryIA/v/ обнаруживали с помощью ферментного иммуносорбентного анализа /EUSA/. Указанный анализ является очень чувствительным специфическим анализом для антигенного материала. Этот анализ используется для определения экспрессии продуктов полипептидного гена. Антисыворотка для таких анализов изготавливается в результате иммунизирования кроликов очищенными с помощью градиента кристаллами Bt /Ang et al., Applied Environ Microbiol. 36:625-626 /1978/, солюбилизованными сульфатом додецил натрия. Анализ ELISA экстрактов из неустойчиво трансформированных клеток кукурузы выполняли, используя стандартные методики /см., например, Harlow, E., и Lane, Д. в "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988/.

Кроме того, методика проведения вышеуказанного анализа описана у Clark et al., Methods In Enzymology, 118: 742-766 /1986/; и Bradford, Anal. Biochem, 72:248 /1976/. Таким образом, такие методики хорошо известны специалистам в данной области. Данные методики раскрываются в настоящем описании в качестве ссылок.

Анализ ELISA выполняли для обнаружения продуктов белка CryIA/v/ в кукурузных протопластах. Продуктированный белок характеризуется ниже в размерности нг Bt на мг общего белка /нг Bt/мг/. Каждую конструкцию испытывали дважды.

pC1B3069 Bt не обнаружено /в обоих опытах/.

pC1B4407 21900нг Bt/мг. общего белка, 21000нг Bt/мг общего белка/

Трансформированные клетки кукурузы продуцировали высокие уровни, порядка приблизительно 20000нг белка cryIA/v/ Bt на мг полного растворимого белка, Bt IP при трансформации геном Bt, оптимизированным относительно кукурузы. Уровень обнаружения с помощью анализа ELISA составляет приблизительно от 1 до 5нг белка cryIA/v/ на мг белка. Поэтому оптимизированный относительно кукурузы ген B обеспечивает увеличение экспрессии этого белка в клетки кукурузы приблизительно в 20000 раз.

Пример 42. Анализ экстракта из трансформированных протопластов на инсектицидную активность к Европейскому зерновому точилющику.

Вестерн-блот анализ также проводили, используя экстракты, полученные из клеток кукурузы, которые были неустойчиво трансформированы с помощью ДНК для экспрессии оптимизированного относительно кукурузы гена. При исследовании, проводимом с помощью вестерн-блотов, указанный белок показывал идентичность с белком, продуцированным в E. coli. В противоположность этому, как показано в вышеприведенном примере 6, необнаруживаемый инсектицидный белок cryIA/v/ Bt продуцировался кукурузными клетками, трансформированными сравнимыми векторами при попытке экспрессировать нативную кодирующую область, выделенную из Bt. Agrobacterium:

Качественные испытания на токсичность насекомых могут быть проведены, используя полученные протопласты. Во всех биопробах готовили суспензии для каждой анализируемой репликации. Репликация считается позитивной, если она вызывает значительно более высокую смертность, чем контрольная. Например, репликации испытывали на их активность против насекомых отряда чешуекрылых, в частности, против Европейского зернового точилющика, Ostrinia nubilalis. 100мкл суспензии протопласты в 0,1% Triton X-100 пипетировали на поверхность искусственной питательной среды совки ипсилон /Bioserv, Inc., Frenchtown, NJ;

F9240/ в чашках Петри с размером крышки 50мм х 10мм. После сушки воздухом в каждую чашку добавляли 10 новорожденных личинок. Смертность фиксировали приблизительно через 4 дня. Когда указанный белок скармливали Европейскому зерновому точильщику, смертность достигала 100%.

Пример 43: Экспрессия синтетического Bt в протопласты растительной ткани кукурузы.

Общую методику выделения протопластов растительной ткани кукурузы применяли согласно Sheen et al., The Plant Cell, 2: 1027-1038 /1990/. Систему трансформации протопласта, используемую Sheen et al., модифицировали за счёт трансформации, опосредствованной полиэтиленгликолем /PEG/, а не электропорации. Эта методика, а также изменения, сделанные в методике выделения, описаны ниже.

Выделение/трансформация протопласта растительной ткани кукурузы.

1. Простерилизуйте и прорастите семена кукурузы для получения листьев. Саженцы выращивайте на свету при температуре 25°C.

2. Стерилизуйте поверхность кусочков листьев 10 - 12-дневных саженцев 5%-ным Clorox в течение 5 минут с последующими несколькими промываниями стерильной дистиллированной водой.

3. Аликвотируйте раствор фермента /см. рецептуру ниже/; 25мл/чашка /чашка Петри размером 100 х 25мм/.

4. Удалите из листьев лишнюю воду и поместите 6-8 двухдюймовых* кусочков /5,08см/ в каждую чашку с ферментом. Обычно готовят 14 чашек с кусочками листьев от приблизительно 100 саженцев.

5. Разрежьте листья на как можно более тонкие продолговатые полоски /2 - 5мм/.

6. Медленно встряхивайте чашки в течение 6,5 - 7 часов при температуре 25°C. Накройте чашки так, чтобы инкубирование происходило в темноте.

7. Перед фильтрованием протопластов промойте микрофильтры с размером ячеек 100мкм 10мл 0,6М маннита. Медленно пикетируйте протопласты через микрофильтры. Промойте чашки 0,6М маннита с целью сбора всех протопластов, оставшихся в чашках.

8. Тщательно пикетируйте отфильтрованную жидкость в 50мл стерильные пробирки. Добавьте равные объемы 0,6М маннита для разбавления.

9. Центрифугируйте в течение 10 минут при 1000об/мин и ускорении 500g на центрифуге /Весили, модель TJ-6 /.

10. Удалите ферментный раствор и выбросьте его. Тщательно ресуспендируйте пеллеты в 5мл маннита. Объедините несколько пеллет. Доведите объем до 50мл, добавляя 0,6М маннита и центрифугируйте.

11. Ресуспендируйте до известного объема /50мл/ и проведите подсчет.

12. После подсчета и осаждения центрифугированием ресуспендируйте протопласты в количестве 2миллиона/мл в ресуспендирующем буфере /рецептура приведена ниже/. Проведите инкубирование осадков в ресуспендирующем буфере в течение по меньшей мере 30 минут перед трансформированием.

Трансформация:

1. Поместите аликвотные пробы плазмид в пробирки /Fisherbrand полистироловые пробирки с культурой, имеющие защелкивающуюся крышку, с размером 17 х 100мм/; по меньшей мере, три копии при одной обработке; используйте эквивалентные количества плазмид с тем, чтобы сравнивать равные количества копий генов.

2. Добавьте 0,5мл протопластов и 0,5 мл 40% полиэтиленгликоля, приготовленного с 0,6М маннита.

3. Мягко встряхивайте для перемешивания и инкубируйте при температуре 25°C в течение 30 минут.

4. Добавьте культуральную среду, содержащую протопласты, с интервалом в 5мин; 1, 2, 5мл.

5. Центрифугируйте в течение 10мин при 1000об/мин и ускорении 500%.

6. Удалите жидкость из пеллеты и ресуспендируйте в 1мл культуральной среды /BMV среда/.

7. Инкубируйте всю ночь в темноте при температуре 25°C.

Рецепт:

Ферментный раствор

0,6М маннита

10мМ MES, pH5,7

1мМ CaCl₂

1мМ MgCl₂

0,1% BSA

стерилизующий фильтр

К этому раствору добавьте следующие ферменты:

1% цитаза RS, 0,1% мацерозим RIO

Промывочный буфер: 0,6М маннита, стерилизующий фильтр

Ресуспендирующий буфер: 0,6М маннита, 20мМ KCl, стерилизующий фильтр

Культуральная среда: рецепт среды BMV, описанный Okuno et al.,
Phytopathology 67:610-615 /1977/

0,6М маннита

4мМ MES, pH5,7

0,2мМ KH₂PO₄

1мМ KNO₃

1мМ MgSO₄

10мМ CaCl₂

Микронутриенты IX K3

Стерилизующий Фильтр

Анализ ELISA трансформированных протопластов выполняли через один день после тоансформации. Анализ проводили так, как это описано ранее. Следующие три эксперимента были проведены с имбредной линией 211Д кукурузы. Конечно, могут использоваться и другие линии кукурузы. Использовали 50мкг плазмиды pC1B4419 и эквивалентное количество других плазмид. Общий растворимый белок определяли с использованием Bio-rad набора /Bradford, Anal Blochem, 72:248 /1976//. Эксперимент по трансформации: Исследованные конструкции:

1. pC1B4419 /Конструкция содержит синтетический Bt под контролем промотора CaMV35S, и маркерных генов 35S/PAT и 35S/GUS/

2. pC1B4420 /конструкция содержит синтетический Bt под контролем сердцевинного промотора, и маркерного на PAT/

3. pC1B4421 /Конструкция содержит синтетический Bt под контролем PEPC промотора/

4. pC1B4423 /Конструкция содержит синтетический Bt под контролем РЯРС поомотора и маркерного гена PAT/PEPC:синтетический-cryIA/v/:PepC интрон:35S + 35S:PAT:35S/

В следующих экспериментах 10...11-дневные саженцы подвергли анализу на продуцирование белка CryIA/v/ Bt с помощью Biorad, набора.

Эксперимент 1 /11-дневные саженцы/:

pC1B4419 15000 ± 3000нг Bt/мг белка

pC1B4420 280 ± 65нг Bt/мг белка

pC1B4421 9000 ± 800нг Bt/мг белка

Эксперимент 2 /10-дневные саженцы/:

pC1B4419 5000 ± 270нг Bt/мг белка

pC1B4420 80 ± 14нг Bt/мг белка

pC1B4421 1600 ± 220нг Bt/мг белка

Эксперимент 3 /11-дневные саженцы/

pC1B4419 21500 ± 1800нг Bt/мг белка

pC1B4420 260 ± 50нг Bt/мг белка

pC1B4421 11900 ± 4000нг Bt/мг белка

pC1B4423 7200 ± 3400нг Bt/мг белка

Вышеприведенные эксперименты подтверждают, что оба промотора CaMV35S и PEPC экспрессируют синтетический белок cryIA/v/ Bt на очень высоких уровнях. Сердцевинный промотор, хотя и менее элективный, также эффективен для экспрессии синтетического белка cryIA/v/.

Пример 44: Стабильная экспрессия синтетического Bt в латук.

Синтетический ген Bt в Agrobacterium векторе pC1B4417 трансформировали в Lactuca sativa cv. Redprize /латук/. Методика трансформации описана в Enomio et al., Plant Cell Reports, 9:6-9 /1990/.

Методика трансформации:

Поверхность семян латука стерилизуют в 5% Clorox в течение 5 минут, после чего следуют несколько промываний стерильной дистиллированной водой. Семена со стерилизованной поверхностью высевают на среды MS с половинной концентрацией /Murashige и Skoog, Physiol. Plant. 15:473-497 /1962//. В качестве эксплантатов для Agrobacterium. инфекции используются семядоли 6-дневных саженцев Redprize, выращенных при освещении 3000лк в течение 16ч при температуре 25°C. Основание и верхушку каждой семядоли удаляют с помощью скальпеля. Эксплантаты погружают на 10 минут в бактериальный раствор, который был культивирован в течение 48ч в минимальных средах AB с соответствующими антибиотиками при температуре 28°C. После блотирования избыточного бактериального раствора на стерильную фильтрованную бумагу эксплантаты высевают на среду MS /0,1мг/л BA и 0,1мг/л NAA/ в течение 2 дней. Затем эксплантаты переносят в элективную среду, содержащую 500мг/л карбенициллина и 50мг/л канамицина. Эксплантаты еженедельно пересевают на свежую среду. В камере для выращивания поддерживаются следующие условия: освещение 2000лк в течение 16ч при температуре 25°C. Приблизительно через 4 недели на крепких на вид каллюсах из каждой чашки, в которой осуществляли пересев, проводят анализ ELISA. Методика проведения указанного анализа такая же, как и описанная выше для протопластов; снова определяют растворимый белок с помощью вышеописанного. Bio-rad набора.

Результаты:

pC1B3021 /канамициновый контроль/ 0

pC1B4417 /чашка 1/ 0

pC1B4417 /чашка 2/ 505нг Bt/мг белка

pC1B4417 /чашка 3/ 45нг Bt/мг белка

pC1B4417 /чашка 4/ 1200нг Bt/мг белка

Этот пример показывает, что двудольные растения также могут проявлять повышенную экспрессию оптимизированного инсектицидного гена.

Пример 45. Конструирование pC1B4429.

pC1B4429 содержит предпочтительный кукурузный специфически-пыльцевой промотор, слитый с оптимизированным относительно кукурузы геном cryIA/v/. Специфически-пыльцевой кукурузный промотор,

используемый в этой конструкции, был получен из плазмиды pKL2, описанной в примере 37. Оптимизированный относительно кукурузы ген *cryIA/v* был получен из плазмиды pC1B4418, также описанной в примере 37.

pKL2 представляет собой плазмиду, которая содержит предпочтительно кукурузный специфически-пыльцевой промотор, слитый с геном *E. coli*, кодирующим бета-глюкуронидазу. Указанная плазида была сконструирована из плазмид pSK110 и pC1B3054. Плазида pSK110 содержит кукурузный специфически-пыльцевой промотор. Плазида pC1B3054, производная от pUC19, содержит ген *E. coli* бета-глюкуронидазы /GUS/, слитый с промотором 35S вируса мозаики цветной капусты /CaMV/. Её конструкция описана в другом месте данной заявки. Этот промотор может быть удалён из указанной плазмиды путём вырезания с помощью Sal I/Hind III с целью получения Фрагмента, содержащего ген GUS, ген, устойчивый к бактериальному ампициллину, и начало ColEI копии. Второй Фрагмент содержит промотор CAMV 35S.

pC1B3054 разрезали рестриктазами Sal I и Hind III, используя стандартные условия, в течение двух часов при комнатной температуре. Затем пробу экстрагировали фенол/хлороформом при стандартных условиях и ДНК восстанавливали путём осаждения этанолом, используя стандартные условия. Восстановленную ДНК ресуспендировали в буфере, подходящем для реакции с телочной фосфотазой из кишечника тёлёнка /CIP/ и зводили в реакцию с CIP, продолжающуюся, всю ночь при температуре 37°C. После реакции с CIP ДНК очищали на геле агарозы, используя стандартные условия, описанные в другом месте данной заявки. pSK110 разрезали с помощью SalI/Hind III в стандартных условиях в течение двух часов при комнатной температуре, а затем очищали ДНК на геле агарозы, используя стандартные условия. Фрагменты восстановленной ДНК лигировали при стандартных условиях в течение двух часов при комнатной температуре, после чего трансформировали в подходящие клетки HB101 штамма *E. coli*. Трансформанты селектировали на L-агаре, содержащем 100мкг ампициллина/мл. Трансформанты идентифицировали для получения требуемой конструкции плазмиды, используя стандартные операции минискрининга. Правильная конструкция получила название pKI-2. -. Для получения pC1B4429 выполняли трёхходовое лигирование, используя стандартные условия, известные специалистам в данной области. Тремя лигированными фрагментами являлись:

1/ Фрагмент Hind III/Vam HI из pC1B4418 с размером приблизительно 4,7kb, содержащий ген *CryIA/v*, ген, устойчивый к бактериальному ампициллину, и начало ColEI копии.

2/ Фрагмент Hind III/Xba I из pKL2 с размером 1,3kb, содержащий специфически-пыльцевой промотор из кукурузы.

3/ Образованный PCR, фрагмент, выделенный из пыльцевого промотора по сайту VamHI, введен на участке, расположенном ниже начала транскрипции. Указанный фрагмент имел размер, равный приблизительно 120bp, а его концы вырезаны с помощью рестриктаз XbaI/ VamHI.

Фрагмент PCR получали, используя 100мкл реакционного объема при стандартных условиях, описанных выше. Праймерами являлись:

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

KE127: 5'-GCG GAT CCG GOT GCG GCG CGG AAC GA-3'

Вышеуказанные праймеры смешивали в реакции PCR с плазмидой pSK105, той плазмидой, которая содержит специфически-пыльцевой промотор из кукурузы.

После окончания реакции PCR, 10мкл пробы помещали на гель агарозы, используя стандартные условия, для того, чтобы убедиться в том, что продукт реакции имел ожидаемый размер. Оставшиеся 90мкл обрабатывали протеиназой K при конечной концентрации, рапной 50мкг/мл в течение 30минут при температуре 37°C. Затем пробу нагревали при температуре 65°C в течение 10 минут, после чего её экстрагировали фенол/хлороформом, используя стандартные операции. ДНК восстанавливали из надосадочной жидкости путем осаждения с помощью двух объемов этанола, используя стандартные условия. После осаждения ДНК восстанавливали центрифугированием в микрофуте. Пеллету промывали один раз 70% этанолом /что является стандартом в данной области/, быстро сушили для полного удаления этанола и ресуспендировали в 17мкл TE буфера. 2мкл, 10х буфера рестриктазы добавляли к имевшимся 0,5мкл Vam HI и 0,5мкл Xba I. ДНК переваривали в течение 1 часа при температуре 37°C для продуцирования фрагмента ДНК, вырезанного с Xba I/Vam HI. После переваривания рестриктазами указанный фрагмент очищали на геле агарозы, содержащем 2% Nusleve (FMC)/1% гель агарозы. Для вымывания ДНК из агарозы применяли ультратонкие фильтры, руководствуясь инструкциями изготовителя. После элюирования ДНК использовали в трехходовом лигировании, описанном выше.

После лигирования ДНК трансформировали в подходящие HB101 клетки штамма *E. coli*, используя стандартные методики. Трансформанты селектировали на чашках с L-агаром, содержащим ампициллин в количестве 100мкг/мл. Колонии, выросшие в избирательных условиях, идентифицировали для плазмидных вставок с использованием стандартных для данной области методик.

Пример 46. Конструирование pC1B4431, вектора для специфически-тканевой экспрессии синтетического гена *cryIA/v* в растениях.

pC1B4431 является вектором, предназначенным для трансформации кукурузы. Он содержит два химерных гена, кодирующих эндотоксин Bt, которые могут быть экспрессированы в кукурузу. Указанные гены представляют собой промотор PEP карбоксилазы/синтетический *cryIA/v* и пыльцевой промотор/ синтетический-*cryIA/v*. Ген PEP карбоксилаза/*cryIA/v* в указанном векторе выделяли из pC1B4421, описанного выше. Пыльцевой промотор также описан выше. На фиг.20 показана карта плазмиды pC1B4431. Плазида pC1B4431 была сконструирована с помощью трехходового лигирования, используя Фрагмент Kpn I/Hind III с размеом приблизительно 3,5kb, содержащий пыльцевой/синтетический-*cryIA/v* из pC114429, фрагмент Hind III/Eco RI PEP/синтетический-*cryIA/v* с размером приблизительно 4,5kb, и фрагмент Kpn I/Eco RI из

блукрипт-вектора с размером 2,6kb.

Другие векторы, включающие пылецевой промотор/синтетический химерный ген *scylA/v*, содержат *pc1B4428* и *pc1B4430* См. фиг.21 и 22. *pc1B4430* также содержит ген *PEPC*/синтетический-Bt, описанный выше.

Пример 47. Продуцирование трансгенной кукурузы, содержащей синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген *scylA/v*.

В нижеприведенном примере для введения в кукурузные клетки, из которых получают трансформированные растения, частиц ДНК использовали *Biolistics*.

Эксперимент КС-65

Продуцирование кукурузы, экспрессирующей синтетический ген *scylA/v*, с использованием специфически-тканевого промотора.

Ткань.

Незрелые кукурузные эмбрионы с длиной приблизительно 1,5...2,5мм, выделяли из колоса генотипа 6M615 через 14 - 15 дней после опыления. Материнское растение выращивали в теплице. Перед выделением эмбрионов колос поверхностно стерилизовали 20% *Clorox* в течение 20мин. и трижды промывали стерилизованной водой. Каждый эмбрион высевали щитковой стороной на площади 2см, 36 эмбрионов на чашку, на среду, иницирующую каллюс, 2ДG4 -и 5 хлорамбеновую среду /основные соли 6, вспомогательные соли B5, MS железо, 2% сахароза с 5мг/л хлорамбена, 20мг/л глюкозы/ и 10мл добавок C4 /Таблица 1/,которые вводили после автоклавирования.

Таблица 1	
Добавки G4	
Ингредиенты	на литр среды
гидролизат казеина	0,5г
пролин	1,38г
никотиновая кислота	0,2мг
пиридоксин-HCl	0,2мг
тиамин-HCl	0,5мг
холин -HCl	0,1мг
рибофлавин	0,05мг
биотин	0,1мг
фолиевая кислота	0,05мг
пантотенат Ca	0,1мг
p-аминобензойная кислота	0,05мг
B12	0,136мкг

Бомбардировка.

Ткань бомбардировали, используя установку *Biolistics PDS-1000He*. Ткань помещали на полке, расположенной на 8см ниже полки задерживающего экрана. Ткань однократно была обстреляна растком микронесителя ДНК/золото, 10мкл высушивали на макронесителе. Использованный задерживающий экран вручную перфорировали на установке *ABRU*, используя трафарет из нержавеющей стали размером 10 x 10. Были применены диски с усилием на разрыв, равным 1550psi /103,5кПа/. После бомбардировки эмбрионы культивировали в темноте при температуре 25°C.

Приготовление ДНК для доставки.

Микронеситель готовили в основном согласно инструкции, прилагаемой к прибору *Biolistics*. В процессе встряхивания 50мкл, 1,0мкМ золотого микронесителя добавляли 5мкл *pc1B4431* /1,23мкг/ мкл/ /№898/ + 2мкл *pc1B3064* /0,895мкг/мкл/ /M56/, затем 50мкл 2,5M $CaCl_2$, а затем 20мкл, 0,1M спермидина /свободное основание тимин-цитазин/. Полученную смесь встряхивали в течение 3 минут и микроругировали 10 секунд. Удаляли надосадочную жидкость и микронесители дважды промывали 250 микролитрами 100% EtOH /чистый для колонки HPLC/ с последующим непродолжительным встряхиванием, центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Микронесители ресуспендировали в 65мкл 100% EtOH.

Формация каллюса.

Эмбрионы переносили в среду, стимулирующую каллюс, с 3мг/л PPT через один день после бомбардирования. Эмбрионы оценивали на инициацию каллюса через 2 и 3 недели после бомбардирования. Любые разрастания переносили на среду обеспечения каллюса, 20G4 + 0,5 2,2-Д среду с 3мг/л PPT. Среда обеспечения каллюса представляет собой основные соли N6, вспомогательные соли B5, MS железо, 2% сахарозу с 0,5мг/л 2,4-Д, 20мг/л глюкозы и 10мл добавок G4, вводимых после рвтоклавирования. Эмбриогенный каллюс субкультивировали каждые 2 недели с целью обновления среды обеспечения каллюса, содержащей 3мг/л PPT. Весь каллюс был инкубирован в темноте при 25°C.

Реакция формации каллюса типа 1 составляла 15%. Каждый эмбрион, который продуцировал каллюс, был культивирован как индивидуальное разрастание, что приводило к появлению индивидуальной линии.

Регенерация.

Через 12 недель после селекции ткань удаляли из среды обеспечения каллюса с PPT и помещали на среду регенерации. Среда регенерации представляет собой 0,25MS3S5BA /0,25мг/л 2,4-Д, 5мг/л RAF /щелочная фосфатаза бактерий/, соли MS, 3% сахароза/в течение 2 недель, после чего следует субкультивирование до среды MS3S для регенерации растений. Через 4 - 10 недель растения удаляли и помещали в гиббереллин A 7

/GA₇/. Линия KC65 0 - 6, которая стала разрастанием Bt №176, продуцировала всего 38 растений.

Анализы

Все растения по мере того, как их помещали в СА₇, испытывали с помощью реакции, использующей хлорфенольный краситель /индикатор CR/ на устойчивость к PPT, как это описано в заявке США 07/759 243, поданной 13.09.31, релевантные разделы которой подведены в данном описании в качестве ссылки. В данном анализе используется чувствительный к pH индикаторный краситель для того, чтобы показать, какие клетки растут в присутствии PPT. Растущие клетки вызывают изменение pH в среде, при этом цвет индикатора меняется с красного на желтый. В этом тесте легко различимы растения, экспрессирующие ген, устойчивый к PPT. /№176 = 8 положительных /30 отрицательных/. Растения, которые согласно тесту CR являются положительными, исследовали с помощью PCR на присутствие синтетического гена BT. /№176 = 5 положительных /2 отрицательных/ 1 отмершее/.

Растения, показавшие положительный результат при реакции PCR, на синтетический ген BT, помещали в фитотрон. Сразу же после помещения их в фитотроне, определяли их характеристики, используя биопробы насекомых и анализ ELISA. В качестве биопробы насекомых использовали стандартный анализ на Европейского жука точильщика /описанный в примере 5A/, при котором небольшие кусочки листа отщипывали от растения и помещали в небольшую чашку Петри с несколькими новорожденными личинками ECB. Обычно исследуют растения высотой 6 дюймов / приблизительно 16 см/. Далее приводятся характеристики растений, приводящих к 100% уничтожению ECB. Результаты анализа ELISA приведены ниже. Растения, показавшие положительный результат, помещали в теплицу.

Теплица/Фертильность

Растение №176-11 опыляли пылью дикого 6N615. Были продуцированы один побег колоса и один колос метелки. Лили сохранены все эмбрионы из колоса метелки /11/ и 56 зерен из колоса 1. 204 зерна, оставшиеся на колосе, были высушены естественным путем. Пыльцу от растения №176-11 подвергали ауткроссингу с различными генотипами кукурузы 5N984, 5NA89 и 3N961. При всех трех ауткроссингах были сохранены эмбрионы /5N984 = 45; 5NA89 = 30; 3N961 = 8/. Большинство зерен оставили на колосьях растений, размещенных в теплице, и высушивали естественным путем. Из растения №176-11 с помощью стандартной методики выделили ДНК и проанализировали, используя саузерн-блот анализ. Было обнаружено, что она содержит последовательности, которые гибридизируются зондами, выделенными из синтетического гена *scu1A/v*, и зондом, выделенным из гена PAT. Указанные результаты свидетельствуют об интеграции этих генов в геном кукурузы.

Эксперимент KC-64.

Продуцирование трансгенной кукурузы, экспрессирующей синтетический ген *scu1A/v*, используя конститутивный промотор.

Ткань.

Незрелые кукурузные эмбрионы с длиной, приблизительно равной 1,5...2,5мм, выделяли из колоса генотипа 6N615 через 14... 15 дней после опыления. Материнское растение выращивали в теплице. Перед выделением эмбрионов колос поверхностно стерилизовали 20% Clorox в течение 20 минут и трижды промывали стерилизованной водой. Каждый эмбрион высевали щитковой стороной на участок с площадью 2см², 36 эмбрионов на чашку, на среду, иницирующую каллус, 2D04 + 5 хлорамбеновая среда /основные соли N6, второстепенные соли B5, MS железо, 2% сахароза с 5мг/л хлорамбена, 20мг/л глюкозы/ и 10мл добавок 04, которые вводятся после автоклавирования.

Таблица 1	
Добавки G4	
Ингредиенты	на литр среды
гидролизат казеина	0,5г
пролин	1,38г
никотиновая кислота	0,2мг
пиридоксин-HCl	0,2мг
тиамин-HCl	0,5мг
холин -HCl	0,1мг
рибофлавин	0,05мг
биотин	0,1мг
фолиевая кислота	0,05мг
пантотенат Ca	0,1мг
p-аминобензойная кислота	0,05мг
B12	0,136мкг

Бомбардировка.

Ткань бомбардировали, используя установку Biolistic PDS-1000He. Ткань помещали на полке, расположенной на 8см ниже полки задерживающего экрана. Ткань была однократно обстреляна раствором микроносителя ДНК/золото, 10мкл высушивали на микроносителе. Использованный задерживающий экран вручную перфорировали на установке ABR, используя трафарет из нержавеющей стали размером 10 x 10. Были применены диски с усилием на разрыв, равным 1550psi /103,5кПа/. После бомбардировки эмбрионы культивировали в темноте при температуре 25°C.

Приготовление ДНК для доставки.

Микроноситель готовили, в основном, согласно инструкции, прилагаемой к прибору Biorollstics, В процессе встряхивания 50мкл 1,0мк золотого микроносителя добавляли 3,2мкл рС1В4418 /0,85мкг/мкл/ /№905/ + 2 мкл рС1В3064 /0,895мкг/мкл/ /№456/ + 1,6мкл рС1В3007А /1,7мкг/мкл/ /№152/, затем 50мкл 2,5М СаС₂, а затем 20мкл 0,1М спермидина /свободное основание, тимидин-цитазин/. Полученную смесь встряхивали в течение 3 минут и микрофугировали 10сек. Надосадочную жидкость удаляли и микроносители дважды. промывали 250 мкл 100% EtOH /чистый для колонки HPLC /с последующим непродолжительным встряхиванием, центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Микроносители ресуспендировали в 65мкл. 100% EtOH.

Формация каллюса.

Эмбрионы переносили в среду инициации каллюса с 3мг/л PPT через 1 день после бомбардировки. Эмбрионы оценивали на инициацию каллюса через 2 и 3 недели после бомбардировки. Любые реакции переносили на среду обеспечения каллюса, 2ДG4 + 0,5 2,4-Д среду с 3мг/л PPT. Среда обеспечения каллюса представляет собой основные соли, вспомогательные соли В5, MS железо, 2% сахарозу с 0,5мг/л 2,4-Д, 20мг/л глюкозы и 10мл добавок С4, вводимых после автоклаивирования. Эмбриогенный каллюс субкультивировали каждые две недели с целью обновления среды обеспечения каллюса, содержащей 3мг/л PPT. Весь каллюс был инкубирован в темноте при 25°C.

Реакция формации каллюса типа 1 составляла 18%. Каждый эмбрион, который продуцировал каллюс, был культивирован как индивидуальное разрастание, что приводило к появлению индивидуальной линии.

Регенерация.

Через 12 недель после селекции ткань удаляли из среды обеспечения каллюса,/ помещали на среду регенерации и инкубировали при температуре 25°C при 16 часах светлого /50мкЕ .м-2. S -1/ и 8 часах темного времени. Среда регенерации представляет собой 0,25MS3S5BA /0,25мг/л 2,4Д, 5мг/л BAP, MS соли, 3% сахароза/ в течение 2 недель, после чего следует субкультивирование до среды MS3S для регенерации растений. Через 4 - 10 недель растения удаляли и помещали в GA₇. Линия KC64 0 - 1, которая стала событием №170 BT, продуцировала 55 растений. Линия KC64 0 - 7, которая стала событием №171, продуцировала всего 33 растения.

Анализ.

Одиннадцать растений по мере того, как их помещали в GA₇, испытывали с помощью реакции, использующей хлорфенольный краситель (%), на устойчивость к PPT, как это описано Shillito et al см. выше, В данном анализе используется чувствительный к pH индикаторный краситель для того, чтобы показать, какие клетки растут в присутствии PPT. Растущие клетки вызывают изменение pH в среде, при этом цвет индикатора изменяется с красного на желтый. В этом тесте легко различимы растения, экспрессирующие ген, устойчивый к PPT, Растения, которые согласно тесту CR являются положительными, исследовали с помощью PCR на присутствие гена BT/Разрастание 170 = 37 положительных/18 отрицательных;. №171 = 25 положительных/ 8 отрицательных/.

Растения, показавшие положительный результат при реакции PCR на синтетический ген BT, помещали в фитатрон. Сразу же после размещения их в фитатроне, определяли характеристики растений, используя биопробы насекомых и анализ ELISA. В качестве биопробы насекомых использовали стандартный анализ на Европейского зернового точильщика /см. ниже/, при котором небольшие кусочки листа отщипывали от растения и помещали в небольшую чашку Петри с несколькими новорожденными личинками ECB, Обычно исследуют растения высотой 6 дюймов. Далее приводятся характеристики растений, приводящих к 100% уничтожению ECB. Результаты анализа ELISA приведены ниже. Растения, показавшие положительный результат, помещали в теплицу.

Скоининг Basta.

Для оценки устойчивости к Basta /хёхст/ отобрали восемь зрелых растений из серии №170. На одном среднем листе растения окрашивали участок с длиной, приблизительно равной 10 - 14см, и шириной, равной ширине листа, с использованием 0, 0,4, 1,0 или 2,0% водного раствора Basta /10мл исходного раствора 200г/л, разведенного деионизированной водой до 100мл /содержащего 2 капли Tween 20 на 100мл. Растения были испытаны на уровень. Восемь дикорастущих растений типа 6N615 приблизительно того же возраста обрабатывали в качестве контрольных. Все растения обследовались на 4-ый и 7-ой день. Все контрольные растения в итоге погибли. На протяжении всего исследования ни одно из растений, взятых из серии №170, не имело повреждений, вызванных гербицидами.

Опыление.

Все колосья метелки, первый колос и, при наличии, второй колос растений из серии №170 и №171 опыляли пылью дикорастущих растений 6N615. По меньшей мере 90% растений были женскими особями.

Пыльцу от растений серии №171 ауткроссировали с генотипами 6N615, 5N984, 5NA89, 6F010, 5NA56, 2N217A , 2ND01 и 3N961. По меньшей мере 90% растений оказались мужскими особями.

Обнаружение экспрессии гена cryIA/в/ в трансгенной кукурузе осуществлялось с помощью биопробы Европейского зернового точильщика /ECB/ и анализа ELISA для количественного определения уровня полученного белка cryIA/в/.

Количественное определение IP cryIA/в/ в листьях трансгенных растений осуществляли, используя ферментные иммуносорбентные тесты /ELHA/, как это описано у Clark M F, Lister RM, Bar-Joseph M:- ELISA Techniques. In: Weissbach A, Weissbach H /eds/ Methods In Enzymology 1181:742-766, Academic Press, Florida /1986/. Для определения отношения нг IP на мг растворимого белка из общих экстрактов образцов листьев были использованы иммуноаффинно очищенные поликлональные антитела кролика и козла, специфические для IP

штамма В.Т.. разновидность kurstaki. Чувствительность анализа двойной ELISA составляла 1 - 5нг IP на мг растворимого белка, используя 50мкг общего белка на лунку в микротитровальном планшете.Е I A.

Кукурузные экстракты изготавливали путем измельчения ткани листа в пластиковых сетчатых мешочках, используя ручной гомогенизатор /AGDIA, Elkart IN./ в присутствии экстрагирующего буфера /50mM Na₂CO₃, рН9,5, 100mM NaCl, 0,05% Triton, 0,05% Tween, 1mM Фенилметилсульфонилфторида /PMSF/ и 1мкМ лейпептина/. Определение белка выполняли, используя Bio-Rad набор /Richmond, CA/.

Используя вышеуказанную методику, первичные кукурузные трансформанты, описанные выше, анализировали на наличие белка cryIA/v/, применяя анализ ELISA. Во время анализа использовали растения с высотой от 6 дюймов /16см/ до приблизительно-3 футов /180см/.

Растение нг Bt/мг растворимого белка 5/27/01

	776-8	0	0
	176-10	700	1585
15	176-11	760	2195
	171-4A	59	
	171-6	50	
	171-8	60	
	171-9	280	
20	171-13	77	
	171-14A	43	
	171-14B	60	
	171-15	55	
	171-16A	13	
25	171-16B	19	
	171-18	19	
	176-30	1160	
	171-32	980	
	171-31	166	
30	171-30	370	
	71-14		
	лист №10	26	
	лист 1	17	
	растение 171-16		
35	лист №9	40	
	лист 1	120	

Анализ на европейского зернового точильщика.

1. Из распрямленного листа кукурузы вырежьте участки с размером от 1 до 4см.

2. Каждый кусочек листа поместите на диск увлажненного фильтра чашки Петри с размером 50 x 9мм.

3. Пять новорожденных личинок Европейского зернового точильщика поместите на каждый кусочек листа /Всего 5 - 20 личинок на растения/.

4. Чашки Петри инкубируйте при температуре 29,5°C.

5. Через 24, 48 и 72 часа просчитайте данные о поврежденных от поедания и погибших листьях.

Пример 49. Экспрессия эндотоксина Bt в потомство трансформированной кукурузы.

Трансформированную кукурузу, полностью способную к оплодотворению, скрещивали с несколькими генотипами кукурузы. Потомство от этих скрещиваний анализировали на их способность к уничтожению Европейского зернового точильщика /ECB/ при проведении стандартного биоанализа на ECB /описанного непосредственно выше/, а также на присутствие белка cryIA/v/, используя анализ ELISA, как это описано выше.

Способность к уничтожению ECB и продуцированию белка cryIA/v/ коррелирована. Эти признаки переданы потомству в отношении 1 : 1, указывая на наличие единственного сайта вставки для активной копии синтетического гена. Указанное соотношение 1 :1 было справедливым как для конститутивных растений, содержащих промотор /синтетический-cryIA/B/, так и для растений, содержащих специфически-тканевый промотор/ синтетический-cry1A/v/ /данные не показаны. На фиг.23A представлена таблица, содержащая данные о небольшой субпопуляции общего количества проанализированного потомства. Указанная таблица отражает ряд различных скрещиваний.

Анализ на насекомых провели с *Diatrea saccharalis* и *Ostrinia nubilalis*, используя листовой материал /как это описано выше/ трансгенного потомства, содержащего оптимизированный относительно кукурузы ген CryIA/v/. Результаты этих анализов показаны на фиг.23B. Они свидетельствуют о том, что пункции оптимизированного относительно кукурузы гена cryIA/v/ в трансформированной кукурузе заключаются в обеспечении устойчивости к сахарному точильщику и *Ostrinia nubilalis*.

Пример 50. Экспрессия гена cryIA/v/ в пыльцу кукурузы.

Потомство трансформированной кукурузы, содержащее химерный пыльцевой промотор/ синтетический ген cryIA/v/, выделенный из pC114431, выращивали в поле до спелости. Пыльцу собирали и анализировали на наличие белка cryIA/v/, используя стандартную методику анализа ELISA, как это описано в другом месте. В пыльце был обнаружен высокий уровень белка cryIA/v/. Потомство от трансформированного 355 промотором/

синтетическим геном *cryIA/v*/ растения выращивали в теплице. Пыльцу от этих растений исследовали используя анализ ELISA, при этом был обнаружен белок *cryIA/v*.

Результаты показаны ниже на фиг.23С.

Признано, что такие факторы, как выбор линий растений, генотипов растений, синтетических последовательностей и т.п., могут также влиять на экспрессию.

Пример 51. Экспрессия гена *cryIA/v*, слитого с преимущественно сердцевинным промотором.

pC1B4433 /фиг.36/ представляет собой плазмиду, содержащую оптимизированный относительно кукурузы ген *cryIA/v*, слитый с преимущественно сердцевинным промотором, выделенным из кукурузы. - Эту плазмиду конструировали путём трёхходового лигирования, содержащего:

1/ pC134418, вырезанный с помощью BstEII и BamHI; Фрагмент с размером 1,8kb;

2/ pBtlnl, вырезанный с помощью NsiI и BstEII; Фрагмент с размером 5,9kb;. pBtlnl описан в другом месте данной заявки;

3/ Фрагмент PCR YI-151 вырабатывали при реакции PCR в стандартных условиях, описанных в другом месте данной заявки. Были использованы следующие праймеры PCR:

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

KE151-A28: 5'-GCT GGT ACC ACG GAT CCG TCG CTT CTG TGC AAC AAC C-3'

После реакции PCR-ДНК проверяли на геле агарозы с тем, чтобы убедиться, что реакция протекала правильно. ДНК восстанавливали из пробы PCR, используя стандартные условия, описание в другом месте, а затем вырезали рестриктазами NsiI и BamHI при стандартных условиях. После вырезания фрагмент помещали на 2% NuSieve гель и восстанавливали требуемую полосу, как это описано в другом месте. ДНК использовали при лигировании, описанном выше.

После лигирования /при стандартных условиях/ ДНК трансформировали в подходящую клетку E.coli.

Трансформацию проводили путём бомбардировки микрочастицами по существу так, как это описано в другом месте данной заявки. Эмбрионы переносили в среду, содержащую 106мкг/мл PPT, через 24 часа после бомбардировки микрочастицами. Полученный в результате каллус переносили в среду, содержащую 40мкг/мл PPT, через четыре недели. Растения регенерировали без селекции.

Для каждой серии опытов с помощью PCR проводили анализ не- большой выборки растений /3 - 5/. Для указания различных положений и расстояний эмбрионов относительно устройства для бомбардировки микрочастицами растениям были присвоены коды. Растения со следующими кодами поместили в теплицу:

JS21A TOP	B.t. PCR позитивные растения
JS21A MID	B.t. PCR позитивные растения
JS21C BOT	B.t. PCR позитивные растения
JS22D MID	B.t. PCR позитивные растения
JS23B MID	B.t. PCR негативные растения /для контроля/

Образцы листьев из регенерированных растений подвергали биоанализу на инсектицидную активность к Европейскому зерновому точильщику, как это описано в примере 48; результаты -представлены на фиг.23Д.

Анализ ELISA - образцов листьев на величину уровня белка *cryIA/v*/ экспрессированного в листья, проводили, как это описано в примере 48; результаты представлены на фиг.24Е.

Представление для регистрации.

Для регистрации Базовой коллекцией сельскохозяйственных культур /NRRL/ /1818N. University St., Peoria, IL 61604/ по условиям Будапештского Договора были представлены следующие плазмиды: pC1B4418, pC1B4420, pC1B4429, pC134431, pC1B4433, pCB5601, pC1B3166 и pC1B3171.

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Настоящее изобретение описано со ссылкой на его специфические варианты выполнения; однако следует понимать, что возможны его многочисленные разновидности, модификации и варианты. Соответственно, такие разновидности, модификации и варианты необходимо рассматривать как находящиеся в границах сущности и объёма настоящего изобретения.

Распечатка последовательностей.

// Общая информация

(I) Заявитель: Evola, Stephen V.

Crossland, Lyle D.

Wright, Martha J.

Launls, Karel L.

Rothstein, Steven J.

(II) Название изобретения: Последовательность синтетической ДНК с улучшенной инсектицидной активностью в кукурузе

(III) Количество последовательностей: 5

(IV) Адрес для переписки:

/A/ Адресат: Цифа-Гейги корпорейшн

/5/ Улица: 7 Skyline Drive

/C/ Город: Hawthorne

/D/ Штат: New York

/E/ Страна: USA

/F/ Почтовый индекс: 10532
 (v) Формуляр компьютера:
 /A/ Тип носителя: гибкий диск
 5 /B/ Коглпьютер: -совместимый с IBM PC
 /C/ Операционная система: PC-ДПС/MS-DOS
 /Д/ Программа: PatentIn Release №1,0, версия №1.25
 (vi) Данные по заявке:
 /A/ номер заявки: США
 10 /B/ дата подачи:
 /C/ классификация:
 (vii) Информация о патентном поверенном/агенте:
 /A/ ФИО:
 /5/ Регистрационный номер:
 15 /C/ Номер дела/досье: CGC 1577/C1P
 (ix) Информация для связи:
 /A/ Телефон: /919/541-8615
 /B/ Телефакс: /919/541-8689
 /2/ Информация а последонптельности 1Д №1
 20 (I) Харпктеристики последовательности:
 /A/ Длина: 4360 комплементарных пар
 /B/ Тип: нуклеиновая кислота
 /C/ Делочечность: одноцепочечная
 /Д/ Топология: линейная
 25 (II) Тип молекулы: ДНК
 (III) Гипотетическая: нет
 (iv) Антисмысловая: нет
 (vi) Источник:
 /A/ Организм:
 30 /B/ Штамм:
 /C/ Индивидуальная культура микроорганизма: ген инсектицидного кристаллического белка cguIA/v/
 (xi) Описание последовательности: последовательность 1Д № 1:

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

	CGGGGCCAGA	ATTCAC TTTT	CCGCTATATG	GAAC TATGGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC	1200
	GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA	1260
5	GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACTATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAATTTG	1320
	CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGGTAGATT	1380
	CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCATC	1440
10	GATTAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTTCA	GCTTTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA	1500
	GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCCTTCAT	1560
	CACAAATTAC	ACAAATACCT	TTAACAAAAT	CTACTAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTCTG	1620
15	TTAAAGGACC	AGGATTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACTTCACCT	GGCCAGATTT	1680
	CAACCTTAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTCGCT	1740
	ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG	1800
20	GGAATTTTTT	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG	1860
	TAGGTTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGTATTTTACG	TTAAGTGCTC	1920
25	ATGTCTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG	1980
	TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA	2040
	CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGTGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT	2100
30	CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAA	GAATTGTCCG	2160
	AGAAAGTCAA	ACATGCGAAG	CGACTTAGTG	ATGAGCGGAA	TTTACTTCAA	GATCCAAACT	2220
	TTAGAGGGAT	CAATAGACAA	CTAGACCGTG	GCTGGAGAGG	AAGTACGGAT	ATTACCATCC	2280
35	AAGGAGGCGA	TGACGTATTC	AAAGAGAATT	ACGTTACGCT	ATTGGGTACC	TTTGATGAGT	2340
	GCTATCCAAC	GTATTTATAT	CAAAAAATAG	ATGAGTCGAA	ATTAAAAGCC	TATACCCGTT	2400
	ACCAATTAAG	AGGGTATATC	GAAGATAGTC	AAGACTTAGA	AATCTATTTA	ATTCGCTACA	2460
40	ATGCCAAACA	CGAAACAGTA	AATGTGCCAG	GTACGGGTTT	CTTATGGCCG	CTTTCAGCCC	2520
	CAAGTCCAAT	CGGAAAATGT	GCCCATCATT	CCCATCATTT	CTCCTTGGAC	ATTGATGTTG	2580
	GATGTACAGA	CTTAAATGAG	GACTTAGGTG	TATGGGTGAT	ATTCAAGATT	AAGACGCAAG	2640
45	ATGGCCATGC	AAGACTAGGA	AATCTAGAAT	TTCTCGAAGA	GAAACCATTA	GTAGGAGAAG	2700
	CACTAGCTCG	TGTGAAAAGA	GCGGAGAAAA	AATGGAGAGA	CAAACGTGAA	AAATTGGAAT	2760
50							
55							
60							
65							

GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT 2820
 CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC 2880
 5 GCGTTCATAG CATTGAGAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG 2940
 CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA 3000
 GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC 3060
 10 ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACACCACC GTTCGGTCTT TGTGTGTTCCG GAATGGGAAG 3120
 CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTACACAG 3180
 CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAAACAG 3240
 15 ACGAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT 3300
 GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG 3360
 GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG 3420
 20 AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG 3480
 GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAGA ATTAGAGTAC TTCCAGAAA 3540
 CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG 3600
 25 AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA AATAAGAAT 3660
 GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT ATATGAATAA AAAACGGGCA 3720
 TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT 3780
 30 TTTTTTGCGA AGGCTTTACT TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG 3840
 CACTACCCCC AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC 3900
 ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAATA TTTTCTGAAG AGCTGTATCG 3960
 35 TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA 4020
 ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC 4080
 GAGTGATTCT CTCGTTTCGAC TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT 4140
 40 CCAGAAGGAC TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT 4200
 TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC AGCACTCAGC 4260
 TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC AAGTACCGAA ACATTTAGCA 4320
 45 CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG 4360

/2/ Информация о последовательности 1Д №2:

(I) Характеристика последовательности:

/A/ Длина: 3474 комплементарных пар

/B/ Тип: нуклеиновая кислота

/C/ Цепочность: одноцепочечная

/D/ Топология: линейная

(II) Тип молекулы: ДНК

(III) Гипотетическая: да

(IV) Антисмысловая: нет

(VI) Источник:

/A/ Организм: Оптимизированный относительно чистой кукурузы синтетический ген cryIA/b/ Bt

Описание последовательности: последовательность 1Д №2:

U A 4 8 1 0 4 C 2

	ATGGACAACA	ACCCCAACAT	CAACGAGTGC	ATCCCCCTACA	ACTGCCTGAG	CAACCCCGAG	60
	GTGGAGGTGC	TGGGCGGCGA	GCGCATCGAG	ACCGGCTACA	CCCCCATCGA	CATCAGCCTG	120
5	AGCCTGACCC	AGTTCCTGCT	GAGCGAGTTC	GTGCCCCGGCG	CCGGCTTCGT	GCTGGGCCCTG	180
	GTGGACATCA	TCTGGGGCAT	CTTCGGCCCC	AGCCAGTGGG	ACGCCTTCCT	GGTGCAGATC	240
	GAGCAGCTGA	TCAACCAGCG	CATCGAGGAG	TTCGCCCCGA	ACCAGGCCAT	CAGCCGCCTG	300
10	GAGGGCCTGA	GCAACCTGTA	CCAGATCTAC	GCCGAGAGCT	TCCGCGAGTG	GGAGGCCGAC	360
	CCCACCAACC	CCGCCCTGCG	CGAGGAGATG	CGCATCCAGT	TCAACGACAT	GAACAGCGCC	420
	CTGACCACCG	CCATCCCCCT	GTTGCGCGTG	CAGAACTACC	AGGTGCCCCCT	GCTGAGCGTG	480
15	TACGTGCAGG	CCGCCAACCT	GCACCTGAGC	GTGCTGCGCG	ACGTGAGCGT	GTTCGGCCAG	540
	CGCTGGGGCT	TCGACGCCGC	CACCATCAAC	AGCCGCTACA	ACGACCTGAC	CCGCCTGATC	600
	GGCAACTACA	CCGACCACGC	CGTGCGCTGG	TACAACACCG	GCCTGGAGCG	CGTGTGGGGC	660
20	CCCACAGCC	GCGACTGGAT	CCGCTACAAC	CAGTTCCGCC	GCGAGCTGAC	CCTGACCGTG	720
	CTGGACATCG	TGAGCCTGTT	CCCCAACTAC	GACAGCCGCA	CCTACCCCAT	CCGCACCGTG	780
25	AGCCAGCTGA	CCCAGGAGAT	CTACACCAAC	CCCGTGCTGG	AGAACTTCGA	CGGCAGCTTC	840
	CGCGGCAGCG	CCCAGGGCAT	CGAGGGCAGC	ATCCGCAGCC	CCCACCTGAT	GGACATCCTG	900
	AACAGCATCA	CCATCTACAC	CGACGCCCAC	CGCGGCGAGT	ACTACTGGAG	CGGCCACCAG	960
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							

U A 4 8 1 0 4 C 2

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

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

/2/ Информация о последовательности 1Д №3:

(I) Характеристики последовательности:

/A/ Длина: 1961 комплементарная пара

/B/ Тип: нуклеиновая кислота

/C/ Цепочечность: одноцепочечная

/D/ Топология: линейная

(II) Тип молекулы: ДНК

(IIi) Гипотетическая: нет

(IV) Антисмысловая: нет

(VI) Источник:

/A/ Организм: укороченный синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген cryIA/в/ Bt

(XI) Описание последовательности: последовательность 1Д №3:

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

45

50

55

60

65

	AACCCCGAGG	TGGAGGTGCT	GGGCGGCGAG	CGCATCGAGA	CCGGCTACAC	CCCCATCGAC	120
	ATCAGCCTGA	GCCTGACCCA	GTTCCTGCTG	AGCGAGTTCTG	TGCCCCGGCGC	CGGCTTCGTG	180
5	CTGGGCCTGG	TGGACATCAT	CTGGGGCATC	TTCGGCCCCA	GCCAGTGGGA	CGCCTTCCTG	240
	GTGCAGATCG	AGCAGCTGAT	CAACCAGCGC	ATCGAGGAGT	TCGCCCCGAA	CCAGGCCATC	300
	AGCCGCCTGG	AGGGCCTGAG	CAACCTGTAC	CAAATCTACG	CCGAGAGCTT	CCGCGAGTGG	360
10	GAGGCCGACC	CCACCAACCC	CGCCCTGCGC	GAGGAGATGC	GCA ¹ CCAGTT	CAACGACATG	420
	AACAGCGCCC	TGACCACCGC	CATCCCCCTG	TTCGCCGTGC	AGAACTACCA	GGTGCCCTG	480
	CTGAGCGTGT	ACGTGCAGGC	CGCCAACCTG	CACCTGAGCG	TGCTGCGCGA	CGTCAGCGTG	540
15	TTCGGCCAGC	GCTGGGGCTT	CGACGCCGCC	ACCATCAACA	GCCGCTACAA	CGACCTGACC	600
	CGCCTGATCG	GCAACTACAC	CGACCACGCC	GTGCGCTGGT	ACAACACCGG	CCTGGAGCGC	660
	GTGTGGGGTC	CCGACAGCCG	CGACTGGATC	AGGTACAACC	AGTTCCGCCG	CGAGCTGACC	720
20	CTGACCGTGC	TGGACATCGT	GAGCCTGTTC	CCCAACTACG	ACAGCCGCAC	CTACCCCATC	780
	CGCACCGTGA	GCCAGCTGAC	CCGCGAGATT	TACACCAACC	CCGTGCTGGA	GA ¹ CTTCGAC	840
	GGCAGCTTCC	GCGGCAGCGC	CCAGGGCATC	GAGGGCAGCA	TCCGCAGCCC	CCACCTGATG	900
25	GACATCCTGA	ACAGCATCAC	CATCTACACC	GACGCCACCC	GCGGCGAGTA	CTACTGGAGC	960
	GGCCACCAGA	TCATGGCCAG	CCCCGTCGGC	TTCAGCGGCC	CCGAGTT ¹ CAC	CTTCCCCCTG	1020
	TACGGCACCA	TGGGCAACGC	TGCACCTCAG	CAGCGCATCG	TGGCACAGCT	GGGCCAGGGA	1080
30	GTGTACCGCA	CCCTGAGCAG	CACCCTGTAC	CGTCGACCTT	TCAACATCGG	CATCAACAAC	1140
	CAGCAGCTGA	GCGTGCTGGA	CGGCACCGAG	TTCGCCTACG	GCACCAGCAG	CAACCTGCCC	1200
	AGCGCCGTGT	ACCGCAAGAG	CGGCACCGTG	GACAGCCTGG	ACGAGATCCC	CCCTCAGAAC	1260
35	AACAACGTGC	CACCTCGACA	GGGCTTCAGC	CACCGTCTGA	GCCACGTGAG	CATGTTCCGC	1320
	AGTGGCTTCA	GCAACAGCAG	CGTGAGCATC	ATCCGTGCAC	CTATGTT ¹ CAG	CTGGATT ¹ CAC	1380
40	CGCAGTGCCG	AGTTCAACAA	CATCATCCCC	AGCAGCCAGA	TCACCCAGAT	CCCCCTGACC	1440
	AAGAGCACCA	ACCTGGGCAG	CGGCACCAGC	GTGGTGAAGG	GCCCCGGCTT	CACCGGCGGC	1500
	GACATCCTGC	GCCGCACCAG	CCCCGGCCAG	ATCAGCACCC	TGCGCGTGAA	CATCACCGCC	1560
45	CCCCTGAGCC	AGCGCTACCG	CGTCCGCATC	CGCTACGCCA	GCACCACCAA	CCTGCAGTTC	1620
	CACACCAGCA	TCGACGGCCG	CCCCATCAAC	CAGGGCAACT	TCAGCGCCAC	CATGAGCAGC	1680
	GGCAGCAACC	TGCAGAGCGG	CAGCTTCCGC	ACCGTGGGCT	TCACCACCCC	CTTCAACTTC	1740
50	AGCAACGGCA	GCAGCGTGTT	CACCCTGAGC	GCCCACGTGT	TCAACAGCGG	CAACGAGGTG	1800
	TACATCGACC	GCATCGAGTT	CGTGCCCGCC	GAGGTGACCT	TCGAGGCCGA	GTACGACCTG	1860
	GAGAGGGCTC	AGAAGGCCGT	GAACGAGCTG	TTCACCAGCA	GCAACCAGAT	CGGCCTGAAG	1920
55	ACCGACGTGA	CCGACTACCA	CATCGATCAG	GTGTAGGAGC	T		1961

/2/. Информация о последовательности 1Д № 4:

(I) Характеристики последовательности:

/A/ Длина: 3508 комплементарных пар

/B/ Тип: нуклеиновая кислота

/C/ Цепочечность: одноцепочечная

/Д/ Топология: линейная

(II) Тип молекулы: ДНК

(IV) Антисмысловая: нет

(VI) Источник:

/A/ Организм: полноразмерный синтетический оптимизированный относительно кукурузы ген CryIA/b/ Bt

(xl) Описание последовательности: последовательность 1Д № 4:

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

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

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

50

55

60

65

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

/2/ Информация о последовательности 1Д №5:

(I) Характеристики последовательности:

/A/ Длина: 1845 комплементарных пар

/B/ Тип: нуклеиновая кислота

40 /C/ Цепочечность: одноцепочечная

/D/ Топология: линейная

(II) Тип молекулы: ДИК

(IV) Антисмысловая: нет

(VI) Источник:

45 /A/ Организм: укороченный синтетически ген Bt /Perlak et al./

(XI) Описание последовательности: последовательность 1Д №5:

50

55

60

65

ATGGACAACA ACCCAAACAT CAACGAATGC ATTCCATACA ACTGCTTGAG TAACCCAGAA 60
 GTTGAAGTAC TTGGTGGAGA ACGCATTGAA ACCGGTTACA CTCCCATCGA CATCTCCTTG 120
 5 TCCTTGACAC AGTTTCTGCT CAGCGAGTTC GTGCCAGGTG CTGGGTTTCGT TCTCGGACTA 180
 GTTGACATCA TCTGGGGTAT CTTTGGTCCA TCTCAATGGG ATGCATTTCCT GGTGCAAATT 240
 GAGCAGTTGA TCAACCAGAG GATCGAAGAG TTCGCCAGGA ACCAGGCCAT CTCTAGGTTG 300
 10 GAAGGATTGA GCAATCTCTA CCAAATCTAT GCAGAGAGCT TCAGAGAGTG GGAAGCCGAT 360
 CCTACTAACC CAGCTCTCCG CGAGGAAATG CGTATTCAAT TCAACGACAT GAACAGCGCC 420
 TTGACCACAG CTATCCCATT GTTCGCAGTC CAGAACTACC AAGTTCCTCT CTTGTCCGTG 480
 15 TACGTTCAAG CAGCTAATCT TCACCTCAGC GTGCTTCGAG ACGTTAGCGT GTTTGGGCAA 540
 AGGTGGGGAT TCGATGCTGC AACCATCAAT AGCCGTTACA ACGACCTTAC TAGGCTGATT 600
 GGAAACTACA CCGACCACGC TGTTCGTTGG TACAACACTG GCTTGGAGCG TGTCTGGGGT 660
 20 CCTGATTCTA GAGATTGGAT TAGATACAAC CAGTTCAGGA GAGAATTGAC CCTCACAGTT 720
 TTGGACATTG TGTCTCTCTT CCCGAATAT GACTCCAGAA CCTACCCTAT CCGTACAGTG 780
 TCCCAACTTA CCAGAGAAAT CTATACTAAC CCAGTTCTTG AGAACTTCGA CGGTAGCTTC 840
 25 CGTGGTTCTG CCCAAGGTAT CGAAGGCTCC ATCAGGAGCC CACACTTGAT GGACATCTTG 900
 AACAGCATAA CTATCTACAG CGATGCTCAC AGAGGAGAGT ATTACTGGTC TGGACACCAG 960
 ATCATGGCCT CTCCAGTTGG ATTCAGCGGG CCCGAGTTTA CTTTCCTCT CTATGGAAT 1020
 30 ATGGGAAACG CCGCTCCACA ACAACGTATC GTTGCTCAAC TAGGTCAGGG TGTCTACAGA 1080
 ACCTTGCTT CCACCTTGTA CAGAAGACCC TTCAATATCG GTATCAACAA CCAGCAACTT 1140
 TCCGTTCTTG ACGGAACAGA GTTCGCCTAT GGAACCTCTT CTAACCTGCC ATCCGCTGTT 1200
 35 TACAGAAAGA GCGGAACCGT TGATTCCTTG GACGAAATCC CACCACAGAA CAACAATGTG 1260
 CCACCCAGGC AAGGATTCTC CCACAGGTTG AGCCACGTGT CCATGTTCCG TTCCGGATTC 1320
 40 AGCAACAGTT CCGTGAGCAT CATCAGAGCT CCTATGTTCT CATGGATTCA TCGTAGTGCT 1380
 GAGTTCAACA ATATCATTCC TTCCTCTCAA ATCACCCAAA TCCCATTGAC CAAGTCTACT 1440
 AACCTTGGAT CTGGAACCTC TGTCGTGAAA GGACCAGGCT TCACAGGAGG TGATATTCTT 1500
 45 AGAAGAACTT CTCCTGGCCA GATTAGCACC CTCAGAGTTA ACATCACTGC ACCACTTTCT 1560
 CAAAGATATC GTGTCAGGAT TCGTTACGCA TCTACCACTA ACTTGCAATT CCACACCTCC 1620
 ATCGACGGAA GGCCTATCAA TCAGGGTAAC TTCTCCGCAA CCATGTCAAG CGGCAGCAAC 1680
 50 TTGCAATCCG GCAGCTTCAG AACCCTCGGT TTTCACTACT CTTTCAACTT CTCTAACGGA 1740
 TCAAGCGTTT TCACCCCTAG CGCTCATGTG TTCAATTCTG GCAATGAAGT GTACATTGAC 1800
 CGTATTGAGT TTGTGCCTGC CGAAGTTACC TTCGAGGCTG AGTAC 1845

Подписи к рисункам:

Фиг.23Е - Экспрессия гена *cryIA/v* в тоангенную кукурузу, используя преимущественно сердцевинный промотор)

Образцы листьев небольших проростков, трансформированных PC1B4433 при использовании методик, описанных в другом месте, были проанализированы на присутствие белка *cryIA/v*, используя анализ ELISA. Было обнаружено, что все растения, экспрессирующие *cryIA/v*, являются инсектицидными в стандартной биопробе на Европейского зернового точильщика.

Следует ответить, что преимущественно сердцевинный промотор имеет низкий, но обнаруживаемый уровень экспрессии в ткань листа кукурузы. Обнаружение белка *cryIA/v* согласуется с таким характером экспрессии.

Фиг.24.

Полная последовательность кукурузного гена *TrpA*, с нитронами и экзонами, начала транскрипции и

трансляции, начало и остановка ДНК.

\$ = начало и конец кДНК; +1 = начало транскрипции; 73^{xxxxxxx} = праймер расширения праймера; ↓ = начало трансляции; +++ = терминирующий кодон; _____ = ССААТ бокс, ТАТАА бокс, поли А дополнительный сайт.

Подчеркнутые последовательности с проставленным над ними № являются праймерами PCR
Фиг.25А - нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена ТрА в ткани кукурузы. Двухчасовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов Dupont Cronex

Фиг.25В - нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена ТрА в ткани кукурузы. Четырехчасовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex.

Фиг.25С - нозеон-блот, показывающий различную экспрессию гена ТрА и ткани кукурузы. 18-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex.

Фиг.25Д - нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена ТрА в ткани кукурузы. 48-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex

Фиг.26 - нозерн-блот, показывающий экспрессию кукурузного гена ТрА в лист и сердцевину линии Фанка 211Д и 5N984 и отсутствие экспрессии в общую РНК семени линии 211Д. 65-Часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов Фирмы Dupont Cronex.

Фиг.27 - геномный саузен линии Фанка 211Д, зондированной ТрА кДНК 8 - 2.
120-часовая экспозиция на пленку при температуре -80 °C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex.

Фиг.28А - расширение праймера, показывающее начало транскрипции гена ТрА и секвенирующий лэддер.
1-часовая экспозиция на пленку при температуре -80 °C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex.

Фиг.28В – защита от РНКазы на участке от + 2bp до + 387bp при трех температурах гибридизации.

16-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Dupont Cronex.

Формула винаходу

1. Фрагмент ДНК, содержащий кодирующую инсектицидный протеин последовательность, оптимизированную для кукурузы, где указанная последовательность содержит по меньшей мере 90% последовательности, оптимизированной для кукурузы, выбранной из группы, включающей
SEQ ID NO:2

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCTTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG 60
 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGGATCGAG ACCGGCTACA CCGCATCGA CATCAGCCTG 120
 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG 180
 GTGGACATCA TCTGGGCGAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC 240
 GAGCAGCTGA TCAACGAGC CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG 300
 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAGATCTAC GCGGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC 360
 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC 420
 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCGCTG CAGAACTACC AGGTGCCCTT GCTGAGCGTG 480
 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTGAGCGT GTTCGGCCAG 540
 CGCTGGGGCT TCGAGCGCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC 600
 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGC 660
 CCGGACAGCC GCGACTGGAT CCGCTACAAC CAGTTCGGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG 720
 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCGCGA CCTACCCCAT CCGCACCGTG 780
 AGCCAGCTGA CCGCGGAGAT GTACACCAAC CCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC 840
 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCGACC CCCACCTGAT GGACATCCTG 900
 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG 960
 ATCATGGCCA GCCCCGTGGG CTTCAGCGGC CCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC 1020
 ATGGGCAACG CCGCCCCCA GCAGCGCATC GTGGCCAGC TGGGCCAGG CGTGTACCGC 1080
 ACCCTGAGCA GCACCTGTA CCGCGCCCC TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG 1140
 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG 1200
 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGCAGCCTG GACGAGATCC CCGCCAGAA CAACAACGTG 1260
 CCCCCCGGCC AGGGCTTCAG CCACCGCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGCGGCTTC 1320
 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGCGCC CCCATGTTCA GCTGGATCCA CCGCAGCGCC 1380
 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC 1440
 AACCTGGCA GCGGCACCG CGTGGTGAAG GGGCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG 1500
 CGCGGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC 1560
 CAGCGCTACC GCGTGCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC 1620
 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC 1680
 CTGCAGAGCG GCAGCTTCG CACCGTGGG TTCAACACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC 1740
 AGCAGCGTGT TCACCTGAG CGCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC 1800
 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCAGGCGCG AGTACGACCT GGAGCGCGCC 1860
 CAGAAGGCGG TGAACGAGCT GTTCACAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG 1920
 ACCGACTACC ACATCGACCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCCTGAGCGA CGAGTTCTGC 1980
 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCAGC CCAAGCGCCT GAGCGACGAG 2040
 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GGCAGCTGGA CCGCGGCTGG 2100
 CCGGCGAGCA CCGACATCAC CATCCAGGGC GCGGACGAGC TGTTCAGGA GAACTACGTG 2160
 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG 2220
 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC 2280
 CTGGAGATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCAGGAGA CCGTGAACGT GCGCGGCACC 2340
 GGCAGCCTGT GCGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGCCCA CCACAGCCAC 2400
 CACTTCAGCC TGGACATCGA CGTGGGCTGC ACCGACCTGA ACGAGGACCT GGGCGTGTGG 2460

GTGATCTTCA AGATCAAGAC CCAGGACGGC CACGCCCGCC TGGGCAACCT GGAGTTCCTG 2520
 GAGGAGAAGC CCCTGGTGGG CGAGGCCCTG GCCCGCGTGA AGCGCGCCGA GAAGAAGTGG 2580
 5 CGCGACAAGC GCGAGAAGCT GGAGTGGGAG ACCAACATCG TGTACAAGEA GGCCAAGGAG 2640
 AGCGTGGACG CCTGTTCGT GAACAGCCAG TACGACCGCC TGCAGGCCGA CACCAACATC 2700
 GCCATGATCC ACGCCGCCGA CAAGCGCGTG CACAGCATCC GCGAGGCCTA CCTGCCCGAG 2760
 CTGAGCGTGA TCCCGCGCGT GAACGCCGCC ATCTTCGAGG AGCTGGAGGG CCGCATCTTC 2820
 10 ACCGCCCTTCA GCCTGTACGA CGCCCGCAAC GTGATCAAGA ACGCGGACTT CAACAACGGC 2880
 CTGAGCTGCT GGAACGTGAA GGCCACGTG GACGTGGAGG AGCAGAACAA CCACCGCAGC 2940
 GTGCTGGTGG TGCCCGAGTG GGAGGCCGAG GTGAGCCAGG AGGTGCGCGT GTGCCCCGGC 3000
 CGCGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC AAGGAGGGCT ACGCGGAGGG CTGCGTGACC 3060
 15 ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG CTGAAGTCA GCAACTGCGT GGAGGAGGAG 3120
 GTGTACCCCA ACAACACCGT GACCTGCAAC GACTACACCG CCACCCAGGA GGAGTACGAG 3180
 GGCACCTACA CCAGCCGCAA CCGCGGCTAC GACGGCGCCT ACGAGAGCAA CAGCAGCGTG 3240
 CCGCGCGACT ACGCCAGCGC CTACGAGGAG AAGGCCCTACA CCGACGGCCG CCGCGACAAC 3300
 20 CCCTGCGAGA GCAACCGCGG CTACGCGGAC TACACCCCCC TGCCCGCCGG CTACGTGACC 3360
 AAGGAGCTGG AGTACTTCCC CGAGACCGAC AAGGTGTGGA TCGAGATCGG CGAGACCGAG 3420
 GGCACCTTCA TCGTGACAG CGTGGAGCTG CTGCTGATGG AGGAGTAGTA CATG 3474
 SEQ ID NO:3
 25 GATCCAACAA TGGACAACAA CCCCACATC AACGAGTGCA TCCCCTACAA CTGCCTGAGC 60
 AACCCCGAGG TGGAGGTGCT GGGCGGCGAG CGCATCGAGA CCGGCTACAC CCCCATCGAC 120
 ATCAGCCTGA GCCTGACCCA GTTCCTGCTG AGCGAGTTGG TGCCCGGGCG CGGCTTCGTG 180
 CTGGGCGTGG TGGACATCAT CTGGGGCATC TTCGGCCCCA GCCAGTGGGA CGCCTTCCTG 240
 30 GTGCAGATCG AGCAGCTGAT CAACCAAGCG ATCGAGGAGT TCGCCCGCAA CCAGGCCATC 300
 AGCCGCTTGG AGGGCCTGAG CAACCTGTAC CAAATCTACG CCGAGAGCTT CCGCGAGTGG 360
 GAGGCGGACC CCACCAACCC CGCCCTGCGC GAGGAGATGC GCATCCAGTT CAACGACATG 420
 AACAGCGCCC TGACCACCGC CATCCCCCTG TTCGCCGTGC AGAACTACCA GGTGCCCTTG 480
 CTGAGCGTGT ACGTGCAAGC GCCTAACCTG CACCTGAGCG TGCTGCGCGA CGTCAGCGTG 540
 35 TTCGGCCAGC GCTGGGGCTT CGAGCGCGCC ACCATCAACA GCGGCTACAA CGACCTGACC 600
 CGCCTGATCG GCAACTACAC CGACCACGCC GTGCGCTGCT ACAACACCGG CCTGGAGCGC 660
 GTGTGGGGTC CCGACAGCGG CGACTGGATC AGGTACAACC AGTTCCGCGG CGAGCTGACC 720
 CTGACCGTGC TGGACATCGT GAGCCTGTTC CCCAACTACG ACAGCCGCAC CTACCCCATC 780
 40 CGCACCGTGA GCCAGTGAC CCGCGAGATT TACACCAACC CCGTGCTGGA GAACCTCGAC 840
 GGCAGCTTCC GCGGACGCGC CCAGGGCATC GAGGGCAGCA TCCGACGCC CCACCTGATG 900
 GACATCCTGA ACAGCATCAC CATCTACACC GACGCCACC GCGGCGAGTA CTACTGGAGC 960
 GGCCACCGA TCATGGCCAG CCGCTCGGC TTCAGCGGCC CCGAGTTAC CTTCGCCCTG 1020
 45 TACGGCACCA TGGGCAACGC TGCACTCAG CAGCGCATCG TGGCACAGCT GGGCCAGGGA 1080
 GTGTACCGCA CCTGAGCAG CACCTGTAC CGTCGACCTT TCAACATCGG CATCAACAAC 1140
 CAGCAGCTGA GCGTGCTGGA CGGCACCGAG TTCGCCTACG GCACCAGCAG CAACCTGCC 1200
 AGCGCGGTGT ACCGCAAGAG CGGCACCGTG GACAGCCTGG ACAGAGATCCC CCTCAGAAC 1260
 50 AACACGTGC CACCTCGACA GGGCTTCAGC CACCGTCTGA GCCACGTGAG CATGTTCCGC 1320
 AGTGGCTTCA GCAACAGCAG CGTGAGCATC ATCCGTGCAC CTATGTTTCA CTGATTAC 1380
 CGCAGTGCGG AGTTCAACAA CATCATCCCC AGCAGCCAGA TCACCCAGAT CCCCCTGACC 1440
 55 AAGAGCACCA ACCTGGGCAG CGGCACCGC GTGGTGAAGG GCCCGGCTT CACCGGCGGC 1500
 GACATCCTGC GCCGCACCG CCGCGGCGAG ATCAGCACCC TCGCGGTGAA CATACCGGCC 1560
 CCCCCTGAGC AGCGCTACCG CGTCCGCATC CGCTACGCCA GCACCACCAA CCTGCAGTTC 1620
 CACACCAGCA TCGACGGCCG CCCCATCAAC CAGGGCAACT TCAGCGCCAC CATGAGCAGC 1680
 60 GGCAGCAACC TGCAGAGCGG CAGCTTCCGC ACCGTGGGCT TCACCACCCC CTCAACTTC 1740
 AGCAACGGCA GCAGCGTGT CACCTGAGC GCGCACGTGT TCAACAGCGG CAACGAGGTG 1800
 TACATCGACC GCATCGAGTT CGTGCCGCC GAGGTGACCT TCGAGGCCGA GTACGACCTG 1860
 GAGAGGGCTC AGAAGGCCGT GAACGAGCTG TTCACCAGCA GCAACAGAT CGGCTGAAG 1920
 65 ACCGACGTGA CCGACTACCA CATCGATCAG GTGTAGGAGC T 1961
 SEQ ID NO:4

	GATCCAACAA TGGACAACAA CCCCAACATC AACGAGTGCA TCCCCTACAA CTGCCTGAGC	60
	AACCCCGAGG TGGAGGTGCT GGGCGGCGAG CGCATCGAGA CCGGCTACAC CCCCATCGAC	120
5	ATCAGCCTGA GCCTGACCCA GTTCCTGCTG AGCGAGTTCC TGCCCGGCGC CGGCTTCGTG	180
	CTGGGCGTGG TGGACATCAT CTGGGGCATC TTCGGCCCCA GCCAGTGGGA CGCCTTCCTG	240
	GTGCAGATCG AGCAGCTGAT CAACCAAGCG ATCGAGGAGT TCGCCCGCAA CCAGGCCATC	300
	AGCCCGCTGG AGGGCCTGAG CAACCTGTAC CAAATCTACG CCGAGAGCTT CCGCGAGTGG	360
10	GAGGCGGACC CCACCAACCC CGCCCTGCGC GAGGAGATGC GCATCCAGTT CAACGACATG	420
	AACAGCGCCC TGACCACCGC CATCCCCCTG TTCGCGTGC AGAACTACCA GGTGCCCCCTG	480
	CTGAGCGTGT ACGTGACAGC CGCCAACTG CACCTGAGCG TGCTGCGCGA CGTCAGCGTG	540
	TTCGGCCAGC GCTGGGGCTT CGACGCCGCC ACCATCAACA GCCGCTACAA CGACCTGACC	600
15	CGCCTGATCG GCAACTACAC CGACCACGCC GTGCGCTGGT ACAACACCGG CCTGGAGCGC	660
	GTGTGGGGTC CCGACAGCCG CGACTGGATC AGGTACAACC AGTTCCGCCG CGAGCTGACC	720
	CTGACCGTGC TGGACATCGT GAGCCTGTTT CCCAACTACG ACAGCCGCAC CTACCCCATC	780
	CGCACCGTGA GCCAGCTGAC CCGCGAGATT TACACCAACC CCGTGCTGGA GAACCTCGAC	840
20	GGCAGCTTCC GCGGACGCGC CCAGGGCATC GAGGGCAGCA TCCGCAGCCC CCACCTGATG	900
	GACATCCTGA ACAGCATCAC CATCTACACC GACGCCACC GCGGCGAGTA CTACTGGAGC	960
	GGCCACCAGA TCATGGCCAG CCCCGTGGC TTCAGCGGCC CCGAGTTCAC CTTCCCCCTG	1020
25	TACGGCACCA TGGGCAACGC TGCACCTCAG CAGCGCATCG TGGCACAGCT GGGCCAGGGA	1080
	GTGTACCPCA CCTGAGCAG CACCCTGTAC CGTCGACCTT TCAACATCGG CATCAACAAC	1140
	CAGCAGCTGA GCGTGCTGGA CGGCACCGAG TTCGCTACG GCACCAGCAG CAACCTGCCC	1200
	AGCGCCGTGT ACCGCAAGAG CGGCACCGT GACAGCCTGG ACGAGATCCC CCTCAGAAC	1260
30	AACAACGTGC CACCTCGACA GGGCTTCAGC CACCGTCTGA GCCACGTGAG CATGTTCCGC	1320
	AGTGGCTTCA GCAACAGCAG CGTGAGCATC ATCCGTGCAC CTATGTTGAG CTGGATTAC	1380
	CGCAGTGCCG AGTTCAACAA CATCATCCCC AGCAGCCAGA TCACCCAGAT CCCCCTGACC	1440
	AAGAGCACCA ACCTGGGCAG CGGCACCAGC GTGGTGAAGG GCCCGGGCTT CACCGGCGGC	1500
35	GACATCCTGC GCCGCACCAG CCCCAGCCAG ATCAGCACCC TGCGCGTGAA CATCACCGCC	1560
	CCCCTGAGCC AGCGCTACCG CGTCCGCATC CGCTACGCCA GCACCACCAA CCTGCAGTTC	1620
	CACACCAGCA TCGACGGCCG CCCCATCAAC CAGGGCAACT TCAGCGCCAC CATGAGCAGC	1680
	GGCAGCAACC TGCAGAGCGG CAGCTTCCGC ACCGTGGGCT TCACCACCCC CTTCAACTTC	1740
40	AGCAACGGCA GCAGCGTGT CACCCTGAGC GCCCAGGTGT TCAACAGCGG CAACGAGGTG	1800
	TACATCGACC GCATCGAGTT CGTGCCCGCC GAGGTGACCT TCGAGGCCGA GTACGACCTG	1860
45		
50		
55		
60		
65		

5 12AGAGGGCTC AGAAGGCCGT GAACGAGCTG TTCACCAGCA GCAACCAGAT CGGCCTGAAG 1920
 ACCGACGTGA CCGACTACCA CATCGATCAG GTGAGCAACC TGGTGGAGTG CCTGAGCGAC 1980
 GAGTTCTGCC TGGACGAGAA GAAGGAGCTG AGCGAGAAGG TGAAGCACGC CAAGCGCCTG 2040
 AGCGACGAGC GCAACCTGCT GCAGGACCCC AACTTCGCGG GCATCAACCG CCAGCTGGAC 2100
 CGCGGCTGGC GCGGCAGCAC CGACATCACC ATCCAGGGCG GCGACGACGT GTTCAAGGAG 2160
 AACTACGTGA CCTGCTGGG CACCTTCGAC GAGTGCTACC CCACCTACCT GTACCAGAAG 2220
 10 ATCGACGAGA GCAAGCTGAA GGCCTACACC CGCTACCAGC TCGCGGGCTA CATCGAGGAC 2280
 AGCCAGGACC TGGAGATCTA CCTGATCCGC TACAACGCCA AGCACGAGAC CGTGAACGTG 2340
 CCGCGCACCG GCAAGCTGTG GCCCTGAGC GCCCCAGCC CCATCGGCAA GTGCGCCAC 2400
 CACAGCCACC ACTTCAGCCT GGACATCGAC GTGGGCTGCA CCGACCTGAA CGAGGACCTG 2460
 15 GCGGTGTGGG TGATCTTCAA GATCAAGACC CAGGACGGCC ACGCCGCGCT GGGCAACCTG 2520
 GAGTTCCTGG AGGAGAAGCC CCTGGTGGGC GAGGCCCTGG CCGCGTGAA GCGCGCCGAG 2580
 AAGAAGTGGC GCGACAAGCG CGAGAAGCTG GAGTGGGAGA CCAACATCGT GTACAAGGAG 2640
 GCCAAGGAGA GCGTGGACGC CCTGTTCGTG AACAGCCAGT ACGACCGCCT GCAGGCCGAC 2700
 20 ACCAACATCG CCATGATCCA CGCCGCGGAC AAGCGCGTGC ACAGCATTGC CGAGGCCTAC 2760
 CTGCCCCGAGC TGAGCGTGAT CCGCGGCGTG AACGCGGCCA TCTTCGAGGA GCTGGAGGGC 2820
 CGCATCTTCA CCGCCTTCAG CCTGTACGAC GCCCGCAACG TGATCAAGAA CCGCGACTTC 2880
 AACAACGGCC TGAGCTGCTG GAACGTGAAG GGCCACGTGG ACGTGGAGGA GCAGAACAAC 2940
 25 CACCGCAGCG TGCTGGTGGT GCCCGAGTGG GAGGCCGAGG TGAGCCAGGA GGTGCGCGTG 3000
 TGCCCCGGCC GCGGCTACAT CCTGCGCGTG ACCGCTTACA AGGAGGGCTA CCGCGAGGGC 3060
 TGCGTGACCA TCCACGAGAT CGAGAACAAAC ACCGACGAGC TCAAGTTCAG CAACTGCGTG 3120
 GAGGAGGAGG TGTACCCCAA CAACACCGTG ACCTGCAACG ACTACACCGC CACCCAGGAG 3180
 30 GAGTACGAGG GCACCTACAC CAGCCGCAAC CGCGGCTACG ACGGCGCCTA CGAGAGCAAC 3240
 AGCAGCGTGC CCGCGGACTA CGCCAGCGCC TACGAGGAGA AGGCCTACAC CGACGGCCGC 3300
 CGCGACAACC CCTGCGAGAG CAACCGCGGC TACGGCGACT ACACCCCGCT GCCCGCCGGC 3360
 TACGTGACCA AGGAGCTGGA GTACTTCCCC GAGACCGACA AGGTGTGGAT CGAGATCGGC 3420
 35 GAGACCGAGG GCACCTTCAT CGTGACGAGC GTGGAGCTGC TGCTGATGGA GGAGTAGTAC 3480
 ATGTGATAGT ACGTAAGCTC GAGGATCT 3508

последовательность, представленную на фигуре 6

40 64 ATGGACCTGC TGCCCGACGC CCGCATCGAG GACAGCCTGT GCATCGCCGA GGGCAACAAC
 MetAspLeu LeuProAsp AlaArgIleGlu AspSerLeu CysIleAla GluGlyAsnAsn
 124 ATCGACCCCT TCGTGAGCGC CAGCACCGTG CAGACCGGCA TCAACATCGC CGGCCGCATC
 IleAspPro PheValSer AlaSerThrVal GlnThrGly IleAsnIle AlaGlyArgIle
 184 CTGGCGGTGC TGGCGGTGCC CTTCGCGGCG CAGCTGGCCA GCTTCTACAG CTTCCTGGTG
 LeuGlyVal LeuGlyVal ProPheAlaGly GlnLeuAla SerPheTyr SerPheLeuVal
 45 244 GGCGAGCTGT GGCCCGCGCG CCGCGACCCAG TGGGAGATCT TCCTGGAGCA CGTGGAGCAG
 GlyGluLeu TrpProArg GlyArgAspGln TrpGluIle PheLeuGlu HisValGluGln
 304 CTGATCAACC AGCAGATCAC CGAGAACGCC CGCAACACCG CCCTGGCCCCG CCTGCAGGGC
 LeuIleAsn GlnGlnIle ThrGluAsnAla ArgAsnThr AlaLeuAla ArgLeuGlnGly
 50 364 CTGGCGGACA GCTTCGCGCG CTACGAGCAG AGCCTGGAGG ACTGGCTGGA GAACCGCGAC
 LeuGlyAsp SerPheArg AlaTyrGlnGln SerLeuGlu AspTrpLeu GluAsnArgAsp
 424 GACGCCCCGA CCGCAGCGT GCTGTACACC CAGTACATCG CCCTGGAGCT GGACTTCCTG
 AspAlaArg ThrArgSer ValLeuTyrThr GlnTyrIle AlaLeuGlu LeuAspPheLeu
 484 AACGCCATGC CCTGTGTCGC CATCCGCAAC CAGGAGGTGC CCCTGCTGAT GGTGTACGCC
 AsnAlaMet ProLeuPhe AlaIleArgAsn GlnGluVal ProLeuLeu MetValTyrAla

60

65

544 CAGGCCGCCA ACCTGCACCT GCTGCTGCTG CGCGACGCCA GCCTGTTCGG CAGCGAGTTC
GlnAlaAla AsnLeuHis LeuLeuLeuLeu ArgAspAla SerLeuPhe GlySerGluPhe
5 604 GGCCTGACCA GCCAGGAGAT CCAGCGCTAC TACGAGCGCC AGGTGGAGCG CACCCGCGAC
GlyLeuThr SerGlnGlu IleGlnArgTyr TyrGluArg GlnValGlu ArgThrArgAsp
664 TACAGCGACT ACTGCGTGA GTGGTACAAC ACCGGCCTGA ACAGCCTGCG CGGCACCAAC
TyrSerAsp TyrCysVal GluTrpTyrAsn ThrGlyLeu AsnSerLeu ArgGlyThrAsn
724 GCGCCGAGCT GGGTGGCCTA CAACCAGTTC CGCCGCGACC TGACCCTGGG CGTGCTGGAC
AlaAlaSer TrpValArg TyrAsnGlnPhe ArgArgAsp LeuThrLeu GlyValLeuAsp
10 784 CTGGTGGCCC TGTTCCTCCAG CTACGACACC CGCACCTACC CCATCAACAC CAGCGCCGAC
LeuValAla LeuPhePro SerTyrAspThr ArgThrTyr ProIleAsn ThrSerAlaGln
844 CTGACCCGCG AGGTGTACAC CGACGCCATC GCGGCCACCG GCGTGAACAT GGCCAGCATG
LeuThrArg GluValTyr ThrAspAlaIle GlyAlaThr GlyValAsn MetAlaSerMet
15 904 AACTGTGACA ACAACAACGC CCCAGCTTC AGCGCCATCG AGGCCGCCGC CATCCGCAGC
AsnTrpTyr AsnAsnAsn AlaProSerPhe SerAlaIle GluAlaAla AlaIleArgSer
964 CCCCACCTGC TGGACTTCTT GGAGCAGCTG ACCATCTTCA GCGCCAGCAG CCGCTGGAGC
ProHisLeu LeuAspPhe LeuGluGlnLeu ThrIlePhe SerAlaSer SerArgTrpSer
1024 AACACCCGCC ACATGACCTA CTGGCGCGGC CACACCATCC AGAGCCGCCC CATCGGCGGC
AsnThrArg HisMetThr TyrTrpArgGly HisThrIle GlnSerArg ProIleGlyGly
20 1084 GGCCTGAACA CCAGCACCCA CGGCGCCACC AACACCAGCA TCAACCCCGT GACCCCTGCG
GlyLeuAsn ThrSerThr HisGlyAlaThr AsnThrSer IleAsnPro ValThrLeuArg
1144 TTCGCCAGCC GCGACGTGTA CCGCACCGAG AGCTACGCCG GCGTGCTGCT GTGGGCGATC
PheAlaSer ArgAspVal TyrArgThrGlu SerTyrAla GlyValLeu LeuTrpGlyIle
25 1204 TACCTGGAGC CCATCCACGG CGTGCCACCC GTGGCTTCA ACTTCACCAA CCCCCAGAAC
TyrLeuGlu ProIleHis GlyValProThr ValArgPhe AsnPheThr AsnProGlnAsn
1264 ATCAGCGACC GCGGCACCGC CAACTACAGC CAGCCCTACG AGAGCCCCGG CCGCAGCTG
IleSerAsp ArgGlyThr AlaAsnTyrSer GlnProTyr GluSerPro GlyLeuGlnLeu
30 1324 AAGGACAGCG AGACCGAGCT GCCCCCGAG ACCACCGAGC GCCCAACTA CGAGAGCTAC
LysAspSer GluThrGlu LeuProProGlu ThrThrGlu ArgProAsn TyrGluSerTyr
1384 AGCCACCGCC TGAGCCACAT CGGCATCATC CTGCAGAGCC GCGTGAACGT GCCCGTGATC
SerHisArg LeuSerHis IleGlyIleIle LeuGlnSer ArgValAsn ValProValTyr
1444 AGCTGGACCC ACCGCGCGC CGACCGCACC AACACCATCG GCCCAACCG CATCACCCAG
SerTrpThr HisArgSer AlaAspArgThr AsnThrIle GlyProAsn ArgIleThrGln
35 1504 ATCCCATGG TGAAGGCCAG CGAGCTGCCC CAGGGCACCA CCGTGGTGCG CGGCCCGGC
IleProMet ValLysAla SerGluLeuPro GlnGlyThr ThrValVal ArgGlyProGly
1564 TTCACCGGCG GCGACATCCT GCGCGGCACC AACACCGGCG GCTTCGGCCC CATCCGCGTG
PheThrGly GlyAspIle LeuArgArgThr AsnThrGly GlyPheGly ProIleArgVal
40 1624 ACCGTGAACG GCGCCCTGAC CCAGCGCTAC CGCATCGGCT TCCGCTACGC CAGCACCGTG
ThrValAsn GlyProLeu ThrGlnArgTyr ArgIleGly PheArgTyr AlaSerThrVal
1684 GACTTCGACT TCTTCGTGAG CCGCGGCGGC ACCACCGTGA ACAACTTCCG CTTCCTGCGC
AspPheAsp PhePheVal SerArgGlyGly ThrThrVal AsnAsnPhe ArgPheLeuArg
1744 ACCATGAACA GCGCGGACGA GCTGAAGTAC GGCAACTTCG TGCGCCGCGC CTTACCAACC
ThrMetAsn SerGlyAsp GluLeuLysTyr GlyAsnPhe ValArgArg AlaPheThrThr
45 1804 CCCTTCACCT TCACCCAGAT CCAGGACATC ATCCGCACCA GCATCCAGGG CCGAGCGGC
ProPheThr PheThrGln IleGlnAspIle IleArgThr SerIleGln GlyLeuSerGly
1864 AACGGCGAGG TGTACATCGA CAAGATCGAG ATCATCCCGG TGACCGCCAC CTTGAGGGC
AsnGlyGlu ValTyrIle AspLysIleGlu IleIlePro ValThrAla ThrPheGluAla
1924 GAGTACGACC TGGAGCGCGC CCAGGAGGCC GTGAACGCC TGTTCACCAA CACCAACCCC
GluTyrAsp LeuGluArg AlaGlnGluAla ValAsnAla LeuPheThr AsnThrAsnPro
50 1984 CGCCGCTGA AGACCGACGT GACCGACTAC CACATCGACC AGGTGAGCAA CCTGGTGCC
ArgArgLeu LysThrAsp ValThrAspTyr HisIleAsp GlnValSer AsnLeuValAla
2044 TGCCTGAGCG ACGAGTTCTG CCTGGACGAG AAGCGCGAGC TGCTGGAGAA GGTGAAGTAC
CysLeuSer AspGluPhe CysLeuAspGlu LysArgGlu LeuLeuGlu LysValLysTyr
55
60
65

2104 GCCAAGCGCC TGAGCGACGA GCGCAACCTG CTGCAGGACC CCAACTTCAC CAGCATCAAC
AlaLysArg LeuSerAsp GluArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPhe ThrSerIleAsn

2164 AAGCAGCCCG ACTTCATCAG CACCAACGAG CAGAGCAACT TCACCAGCAT CCACGAGCAG
LysGlnPro AspPheIle SerThrAsnGlu GlnSerAsn PheThrSer IleHisGluGln

2224 AGCGAGCAGC GCTGGTGGGG CAGCGAGAAC ATCACCATCC AGGAGGGCAA CGACGTGTTT
SerGluHis GlyTrpTrp GlySerGluAsn IleThrIle GlnGluGly AsnAspValPhe

2284 AAGGAGAACT ACGTGACCCT GCCCGGCACC TTCAACGAGT GCTACCCAC CTACCTGTAC
LysGluAsn TyrValThr LeuProGlyThr PheAsnGlu CysTyrPro ThrTyrLeuTyr

2344 CAGAAGATCG GCGAGAGCGA GCTGAAGGCC TACACCCGCT ACCAGCTGCG CGGCTACATC
GlnLysIle GlyGluSer GluLeuLysAla TyrThrArg TyrGlnLeu ArgGlyTyrIle

2404 GAGGACAGCC AGGACCTGGA GATCTACCTG ATCCGCTACA ACGCCAAGCA CGAGACCCCTG
GluAspSer GlnAspLeu GluIleTyrLeu IleArgTyr AsnAlaLys HisGluThrLeu

2464 GACGTGCCCG GCACCGAGAG CCTGTGGCCC CTGAGCGTGG AGAGCCCAT CGGCCGCTGC
AspValPro GlyThrGlu SerLeuTrpPro LeuSerVal GluSerPro IleGlyArgCys

2524 GCGGAGCCCA ACCGCTGCGC CCCCCACTTC GAGTGGAACC CGACCTGGA CTGCAGCTGC
GlyGluPro AsnArgCys AlaProHisPhe GluTrpAsn ProAspLeu AspCysSerCys

2584 CGCGACGGCG AGAAGTGGCG CCACCACAGC CACCACTTCA GCCTGGACAT CGACGTGGGC
ArgAspGly GluLysCys AlaHisHisSer HisHisPhe SerLeuAsp IleAspValGly

2644 TGCACCGACC TGCACGAGAA CCTGGGCGTG TGGGTGGTGT TCAAGATCAA GACCCAGGAG
CysThrAsp LeuHisGlu AsnLeuGlyVal TrpValVal PheLysIle LysThrGlnGlu

2704 GGCCACGCCC GCCTGGGCAA CCTGGAGTTC ATCGAGGAGA AGCCCTGCT GGGCGAGGCC
GlyHisAla ArgLeuGly AsnLeuGluPhe IleGluGlu LysProLeu LeuGlyGluAla

2764 CTGAGCCGCG TGAAGCGCGC CGAGAAGAAG TGGCGCGACA AGCGCGAGAA GCTGCAGCTG
LeuSerArg ValLysArg AlaGluLysLys TrpArgAsp LysArgGlu LysLeuGlnLeu

2824 GAGACCAAGC GCGTGACAC CGAGGCCAAG GAGGCCGTGG ACGCCCTGTT CGTGGACAGC
GluThrLys ArgValTyr ThrGluAlaLys GluAlaVal AspAlaLeu PheValAspSer

2884 CAGTACGACC GCCTGCAGGC CGACACCAAC ATCGGCATGA TCCACGCGC CGACAAGCTG
GlnTyrAsp ArgLeuGln AlaAspThrAsn IleGlyMet IleHisAla AlaAspLysLeu

2944 GTGCACCGCA TCCGCGAGGC CTACCTGAGC GAGCTGCCCG TGATCCCCCG CGTGAACGCC
ValHisArg IleArgGlu AlaTyrLeuSer GluLeuPro ValIlePro GlyValAsnAla

3004 GAGATCTTCG AGGAGCTGGA GGGCCACATC ATCACCGCCA TCAGCCTGTA CGACGCCCGC
GluIlePhe GluGluLeu GluGlyHisIle IleThrAla IleSerLeu TyrAspAlaArg

3064 AACGTGGTGA AGAACGGCGA CTTCAACAAC GGCTGACCT GCTGGAACGT GAAGGGCCAC
AsnValVal LysAsnGly AspPheAsnAsn GlyLeuThr CysTrpAsn ValLysGlyHis

3124 GTGACGTGC AGCAGAGCCA CCACCGCAGC GACCTGGTGA TCCCGAGTG GGAGGCCGAG
ValAspVal GlnGlnSer HisHisArgSer AspLeuVal IleProGlu TrpGluAlaGlu

3184 GTGAGCCAGG CCGTGC CGTGTGCCCGT TCGCGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC
ValSerGln AlaValArg ValCysProGly CysGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr

3244 AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC ATCCACGAGA TCGAGAACA CACCGACGAG
LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu

3304 CTGAAGTTCA AGAACCGCA GGAGGAGGAG GTGTACCCCA CCGACACCG CACCTGCAAC
LeuLysPhe LysAsnArg GluGluGluGlu ValTyrPro ThrAspThr GlyThrCysAsn

3364 GACTACACCG CCCACGAGG CACCGCCGCG TCGCGCGACG CCTGCAACAG CCGCAACGCC
AspTyrThr AlaHisGln GlyThrAlaGly CysAlaAsp AlaCysAsn SerArgAsnAla

3424 GGCTACGAGG ACGCCTACGA GGTGGACACC ACCGCCAGCG TGAACCTCAA GCCACCTAC
GlyTyrGlu AspAlaTyr GluValAspThr ThrAlaSer ValAsnTyr LysProThrTyr

3484 GAGGAGGAGA CCTACACCGA CGTGCGCCGC GACAACCACT GCGAGTACGA CCGCGGCTAC
GluGluGlu ThrTyrThr AspValArgArg AspAsnHis CysGluTyr AspArgGlyTyr

3544 GTGAACCTACC CCCCCGTGCC CGCCGGCTAC GTGACCAAGG AGCTGGAGTA CTTCCCCGAG
ValAsnTyr ProProVal ProAlaGlyTyr ValThrLys GluLeuGlu TyrPheProGlu

3604 ACCGACACCG TGTGGATCGA GATCGGCGAG ACCGAGGGCA AGTTCATCGT GGACAGCGTG
ThrAspThr ValTrpIle GluIleGlyGlu ThrGluGly LysPheIle ValAspSerVal

3664 GAGCTGCTGC TGATGGAGGA GTAG
GluLeuLeu LeuMetGlu Glu---

последовательность, представленную на фигуре 7

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
5 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspileSerLeu
121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGCG CCGCTTCGT GCTGGGCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTGGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspile IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
10 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
361 CCCACCAACC CCGCCCTGGC CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
15 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
20 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCC GCGAGCTGAC CCGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
25 721 CTGACATCG TGAGCCTGTT CCCCACCTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspile ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
781 AGCCAGCTGA CCGCGGAGAT TTACACCAAC CCGTGCTGG AGAACTCGA CCGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
30 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspileLeu
901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
35 961 ATCATGGCCA GCCCCGTGG CTTAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGGTACCAGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
1081 ACCCTGAGCA GCACCTCTA CGTTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
40 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
45 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
50 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGCGCG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspileLeu

55

60

65

1501 CGCCGCAACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
5 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
10 1741 AGCAGCGTGT TCACCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCGG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
15 1921 ACCGACTACC ACATCGAT/CA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTATCTGATGAATTTGT
ThrAspTyr HisIleAsp/GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
1981 CTGGATGAAA AAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
20 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAATTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GCGGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
25 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
30 2341 GGTTCCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGCCCA TCATTCCCAT
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysAla HisHisSerHis
2401 CATTCTCCTT TGGACATTGA TGTGGATGT ACAGACTTAA ATGAGGACTT AAGTGTATGG
HisPheSer LeuAspIle AspValGlyCys ThrAspLeu AsnGluAsp LeuGlyValTrp
2461 GTGATATTCA AGATTAAGAC GCAAGATGGC CATGCAAGAC TAGGAAATCT AGAATTTCTC
ValIlePhe LysIleLys ThrGlnAspGly HisAlaArg LeuGlyAsn LeuGluPheLeu
35 2521 GAAGAGAAAC CATTAGTAGG AGAAGCACTA GCTCGTGTGA AAAGAGCGGA GAAAAAATGG
GluGluLys ProLeuVal GlyGluAlaLeu AlaArgVal LysArgAla GluLysLysTrp
2581 AGAGACAAAC GTGAAAAATT GGAATGGGAA ACAAATATTG TTTATAAAGA GCGAAAAGAA
ArgAspLys ArgGluLys LeuGluTrpGlu ThrAsnIle ValTyrLys GluAlaLysGlu
40 2641 TCTGTAGATG CTTTATTTGT AAATCTCAA TATGATAGAT TACAAGCGGA TACCAACATC
SerValAsp AlaLeuPhe ValAsnSerGln TyrAspArg LeuGlnAla AspThrAsnIle
2701 GCGATGATTC ATGCGGCAGA TAAACGCGTT CATAGCATTG GAGAAGETTA TCTGCTGAG
AlaMetIle HisAlaAla AspLysArgVal HisSerIle ArgGluAla TyrLeuProGlu
2761 CTGTCTGTGA TTCCGGGTGT CAATGCGGCT ATTTTGAAG AATTAGAAGG GCGTATTTTC
LeuSerVal IleProGly ValAsnAlaAla IlePheGlu GluLeuGlu GlyArgIlePhe
2821 ACTGCATTCT CCCTATATGA TCGAGAAAT GTCATTAAAA ATGGTGATTT TAATAATGGC
ThrAlaPhe SerLeuTyr AspAlaArgAsn ValIleLys AsnGlyAsp PheAsnAsnGly
2881 TTATCCTGCT GGAACGTGAA AGGGCATGTA GATGTAGAAG AACAAAACAA CCACCGTTCC
LeuSerCys TrpAsnVal LysGlyHisVal AspValGlu GluGlnAsn AsnHisArgSer
50 2941 GTCCTTGTGG TTCCGGAATG GGAAGCAGAA GTGTCACAAG AAGTTCGTGT CTGTCCGGGT
ValLeuVal ValProGlu TrpGluAlaGlu ValSerGln GluValArg ValCysProGly

65

3001 CGTGGCTATA TCCTTCGTGT CACAGCGTAC AAGGAGGGAT ATGGAGAAGG TTGCGTAACC ,
ArgGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr
5 3061 ATTCATGAGA TCGAGAACAA TACAGACGAA CTGAAGTTTA GCAACTGTGT AGAAGAGGAA
IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu LeuLysPhe SerAsnCys ValGluGluGlu
3121 GTATATCCAA ACAACACGGT AACGTGTAAT GATTATACTG CGACTCAAGA AGAATATGAG
ValTyrPro AsnAsnThr ValThrCysAsn AspTyrThr AlaThrGln GluGluTyrGlu
3181 GGTACGTACA CTTCCTCGTAA TCGAGGATAT GACGGAGCCT ATGAAAGCAA TTCTTCTGTA
GlyThrTyr ThrSerArg AsnArgGlyTyr AspGlyAla TyrGluSer AsnSerSerVal
10 3241 CCAGCTGATT ATGCATCAGC CTATGAAGAA AAAGCATATA CAGATGGAGC AAGAGACAAT
ProAlaAsp TyrAlaSer AlaTyrGluGlu LysAlaTyr ThrAspGly ArgArgAspAsn
3301 CCTTGTGAAT CTAACAGAGG ATATGGGGAT TACACACCAC TACCAGCTGG CTATGTGACA
ProCysGlu SerAsnArg GlyTyrGluAsp TyrThrPro LeuProAla GlyTyrValThr
3361 AAAGAATTAG AGTACTTCCC AGAAACCGAT AAGGTATGGA TTGAGATCGG AGAAACGGAA
LysGluLeu GluTyrPhe ProGluThrAsp LysValTrp IleGluIle GlyGluThrGlu
15 3421 GGAACATTCA TCGTGGACAG CGTGGAAATTA CTTCTTATGG AGGAATAA
GlyThrPhe IleValAsp SerValGluLeu LeuLeuMet GluGlu---

последовательность, представленную на фигуре 9

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
20 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGGCA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
25 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCCA ACCAGGCCAT CAGCCCGCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
30 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCGGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCTT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
35 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
541 CGCTGGGGCT TCGACGCGCG CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
501 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
40 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CTTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
45 781 AGCCAGCTGA CCGCGGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCGAGC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
50 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
5 1051 ACCCTGAGCA GCACCTGTGA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
10 1261 CCACCTCGAG AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
1361 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCTGAC CAAGAGCACC
15 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
1441 AACCTGGGCA GCGGCACCGA CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
20 1551 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCGG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
25 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
1741 AGCAGCGTGT TCACCTGAG CGCCACGCTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
30 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
35 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTC
40 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
2161 ACGCTATTGG GTACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
2221 AGCAAGCTGA AGGCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
45 2281 CTGGAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
2341 GGCAGCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
2401 TGCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
50 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
2461 TGCGCCCAAC ACAGCCACCA CTTACGCTTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
55
60
65

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
5 2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
10 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
15 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGGT CCTTGTGTGT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu
20 3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCTG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATA
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
25 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTACTTGCG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
30 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATI
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
35 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAAATTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
3541 GAATAA
Glu---

последовательность, представленную на фигуре 11

40 1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
45 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCCCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
50 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

55

60

65

361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCI
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
5 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACCTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATI
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
10 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CTGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
15 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCACCTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGACGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
20 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
961 ATCATGGCCA GCCCGCTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
25 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
1081 ACCCTGAGCA GCACCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
30 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
35 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
1361 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
40 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
1501 CGCCGCACCA GCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACC GC CCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
1561 CAGCGCTACC CCGTCCGCAT CCGTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
45 1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
50 1741 AGCAGCGTGT TCACCTGAG CGCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
55
60
65

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

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCACG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GGCGACGACG TGTTCAGGA GAACTACGTG
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACCCTGTCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 CTGGAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2441 TGCCTCCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CCGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACCC ACAGCCACCA CTTGAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2541 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACCGTTCA TAGCATTCTGA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCT TGGCTATATC CTTCTGTCTA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTATACTGCG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGATGGATT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGGAATTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAA
Glu---

последовательность, представленную на фигуре 13

1 ATGGACAACA ACCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
5 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCGCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTGGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
10 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
15 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCT GCTGAGCGTG
LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
20 541 CGCTGGGGCT TCGACGCGCG CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGGCGTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTyr TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCGTACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
25 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
781 AGCCAGCTGA CCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
30 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
961 ATCATGGCCA GCCCGTGGG CTTGAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
35 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCAGAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
40 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal

1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
5 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
1351 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCAGCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
10 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
1501 CGCCGCACCA GCCCCGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
15 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCGG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
20 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
1741 AGCAGCGTGT TCACCTGAG CGCCACGCTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
25 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCAG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
30 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
2101 CGAGGCAGCA CGATATCAC CATCCAGGGC GCGCAGCAGC TGTTCAGGA GAACCTACGTG
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
35 2161 ACCCTGCTGG GCACCTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
40 2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCAGGAGA CCGTGAACGT CCCCAGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
45 2401 TGCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
2461 TGCGCCCAAC ACAGCCACCA CTTAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspileAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
50 2581 GGCAATCTAG AGTTCCTGGA GGAGAAGCCC CTGGTGGGCG AGGCCCTGGC CCSCGTGAAG
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
2641 CGCGCCGAGA AGAAGTGGCG CGACAAGCGC GAGAAGCTGG AGTGGGAGAC CAACATCGTG
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
55 2701 TACAAGGAGG CCAAGGAGAG CGTGGACGCC CTGTTCGTGA ACAGCCAGTA CGACCGCCTG
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

60

65

2761 CAGGCCGACA CCAACATCGC CATGATCCAC GCCGCCGACA AGCGCGTGCA CAGCATTCCG
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAGGCCTACC TGCCCGAGCT GAGCGTGATC CCCGGCGTGA ACGCCGCCAT CTTCGAGGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 CTCGAGGGCC GCATCTTCAC CGCCTTCAGC CTGTACGACG CCCGCAACGT GATCAAGAAC
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GCGCACTTCA ACAACGGCCT GAGCTGCTGG AACGTGAAGG GCCACGTGGA CGTGGAGGAG
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAGAACAACC ACCCGAGCGT GCTGGTGGTG CCCGAGTGGG AGGCCGAGGT GAGCCAGGAG
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

3061 GTGCGCGTGT GCCCGGCCG CGGCTACATC CTGCGCGTGA CCGCCTACAA GGAGGGCTAC
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GCGCAGGGCT GCGTGACCAT CCACGAGATC GAGAACAACA CCGACGAGCT CAAGTTCAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGCGTGG AGGAGGAGGT GTACCCCAAC AACACCGTGA CCTGCAACGA CTACACCGCG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACCCAGGAGG AGTACGAGGG CACCTACACC AGCCGCAACC GCGGCTACGA CGGCGCCTAC
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAGAGCAACA GCAGCGTGCC CGCCGACTAC GCCAGCGCCT ACGAGGAGAA GGCCTACACC
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

3361 GACGGCCGCC GCGACAACCC CTGCGAGAGC AACCGCGGCT ACGGCGACTA CACCCCTG
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCGCCCGGCT ACGTGACCAA GGAGCTGGAG TACTTCCCCG AGACCGACAA GGTGTGGATC
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGCG AGACCGAGGG CACCTTCATC GTGGACAGCG TGGAGCTGCT GCTGATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAGTAG
Glu---

последовательность, представленную на фигуре 15

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

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

121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCGGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCCTG
SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu

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

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

301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCGGAC
GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp

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

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

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

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

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

5 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCGACCGTG
ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal

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

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

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

10 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

961 ATCATGGCCA GCCCGTCCG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

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

15 1081 ACCCTGAGCA GCACCTGTGA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu

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

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

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

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

25 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr

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

30 1501 CGCCGCACCA GCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer

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

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

35 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCGG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly

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

40 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla

1851 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

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

45 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

2041 CGGAATTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGCA AGTGCAGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TGCCTCCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACCC ACAGCCACCA CTTAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGATAGTGCT TTATTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTGAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTGCA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTC ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGTGATTITA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTACTGCGG
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGAAT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAAATTA TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAAG
Glu---

2. Фрагмент ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин и является последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, последовательность, представленную на фигуре 7.

3. Фрагмент ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин, который термостабилен по сравнению с нативным CryIA(b) протеином, и является последовательностью, выбранной из группы, включающей последовательности, представленные на фигуре 9, фигуре 11, фигуре 13, фигуре 15.

4. Фрагмент ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная кодирующая последовательность содержит последовательность, которая кодирует CryIB протеин и представлена на фигуре 6.

5. Фрагмент ДНК по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно включает первый промотор, обеспечивающий направленную экспрессию нуклеотидной последовательности в растительной клетке, операбельно связанный с указанной кодирующей последовательностью.

6. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что указанный промотор обеспечивает направленную

экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в клетке кукурузы.

7. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что указанный промотор выбран из группы, включающей индуцибельные промоторы, конститутивные промоторы, промоторы, регулируемые в процессе развития или во времени, тканепредпочтительные или тканеспецифические промоторы.

8. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что указанный промотор обеспечивает направленную специфическую для зеленых тканей экспрессию указанной кодирующей последовательности в растительных клетках.

9. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что указанный промотор выбран из группы, включающей CaMV35S промотор, CaMV19S промотор, промотор PEP карбоксилазы, промотор, обеспечивающий предпочтительную для сердцевины стебля экспрессию, и промотор, обеспечивающий специфичную для пыльцы экспрессию.

10. Фрагмент ДНК по п. 8, отличающийся тем, что указанный промотор является промотором PEP карбоксилазы.

11. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что указанный промотор обеспечивает предпочтительную для сердцевины стебля экспрессию, и содержит последовательность, представленную на фигуре 24

```
1  GAATTCGGATCCATTAAAGAAGTCTTTGAACAGATTCTAGAGATCTAGTTTAAATGAGCTC 60
61  CCAAAAGTCTTTGAAAAAATTCAGCGGGGAGGCCATTAGGGCAGGGGTACTGTTATGTTTT 120
121  AAAGAGAACACCACTTTCTTGATCTCTTCTAAAGAGAAATGTTTGTAAAGAGGATCCTG 180
181  TCCTCCTCATCCAACCTTTTCATCGGCAAAATTTTTCATAGAGATATTAGAGGCAAGAGAG 240
241  GGGCCAAAAAGATCCATGTAATGGAAGTGGCCACCTGGTTGATACCTCCCTCATCTTCA 300
301  ACAGAAAAATCCATTATGAAAAAGTGAATGGATTTTAAACTCTTCTTTTCTCCCTTTTG 360
361  CAATGAGCTGAAAAATATCTGGTATTATCTCATCACCCCTCATTAATGAATCTGTCCCTAG 420
421  CAATTTGCTTTTCTTTGATCCCTTCTGCAGCCACCATGTTTCTTAAATCCACTGCATAT 480
481  CAAGCTTTTCCAACTCTATCAGAATCTGAGATGGCTGCAATCTCTCTCATTTTCTCAAGGA 540
541  TATCGATGTTATCCATAAGGTATTTCTTGAACCTCTTATATTTCCCTTCGACATTTATAT 600
601  TCCATCCTTTTCAACATTTTGTGTTCAATCTTTTGTGTTTTTCTTTTCCAAACATCGA 660
661  TACATTTCTGCTCCTCACAGGTAAGGACGAGCTTTCAAAAAACCTTCTGCTTTAAAGTC 720
721  AGGTCTGAGCCTCCAGCAAGCTCACATATCTAAAGTCCCTCTCTTAGTTGGGACAGAG 780
781  TCAGTGCTAAGACACATGGGAACATGACCAGAAAAAAAATCATATTTAGCCCAAGAGAC 840
841  AACAATATTCTTGTACTGCAAGTCTCGTTATGGGCTAGCAAAGGAATCTACCCAACTTCT 900
901  CAAATGTGTTGGGATGTCAAGTATATAGACTATTTCATCAGTTCCAACCTCTATCAAACGT 960
961  GCAGCTCAATTATAGAGTTGAATAAAGTGCTCCATCTATTTGTCTTATCCTCATATTTG 1020
1021 GTTAAGATATTTAAATCACCTCCCACCAACATTTAAAGTGCACCATTTAAAGTGGCTCGC 1080
1081 GAGCACCAAACCGCTGAAAACCGGAAATGTTTAGCACGTTGGCAGCGGGACCTTTTCTA 1140
1141 TCTCATCGTGTCTTCTGTTGTCCACCACGGCCACGGGCCAACGCTCCTCCATCCTGTAG 1200
1201 TGTAAGATATATTCCATTTGCGACCGAGCCGAGCATCGATCCAGCCACACTGGCCACTGC 1260

84
1261 CAGCCAGCCATGTGGCACTCCTACGTATACTACGTGAGGTGAGATTCACTCACATGGGAT 1320
-465 -405
```

1321 GGGACCGAGATATTTTACTGCTGTGGTTGTGTGAGAGATAATAAGCATTATGACGATT 1380
1381 GCTGAACAGCACACCATGCGTCCAGATAGAGAAAGCTTCTCTCTTTATTCGCATGCA 1440
5 1441 TGTTTCATTATCTTTTATCATATATATATAACCATATTAATGATTCTTCGTTCCAATT 1500
-285 -226
1501 TATAATTCATTTGACTTTTTTATCCACCGATGCTCGTTTTATTAATAAATAATATAAT 1560
-225 -166
1561 TATTGTTACTTTTTGTGTGAATATTGTTTAGCATATAATAAACTTTGATACTAGTATGTT 1620
-165 -106
10 1621 TCCGAGCAAAAAAAAAATATTAATATTTAGATTACGAGCCCATTAATTAATTATTCGAG 1680
-105 -46
83 +1
1681 ACAAGCGAAGCAAAGCAAAGCAAGCTAATGTTGCCCTGCTGTGCATGCAGAGGCCCGCT 1740
-45 +15
1741 CTTGCTATAAACGAGGCAGCTAGACCGGACTCGACTCATCAGCCTCATCAACCTCGAAGA 1800
+16 +75
1801 AGGAGGAACGAAACGGAACAGGTTGTTGCACAGAAGCGACATGGCTTTCGCGCCCAAAACGT 1860
+76 M A F A P K T S +135
1861 CCTCCTCCTCCTCGCTGTCTCGGCGTTGCAGGCAGCTCAGTCGCCGCCGCTGCTCCTGA 1920
+126 S S S S L S S A L Q A A Q S P P L L L R +195
20 1921 GCGGATGTCGTCGACCGCAACACCGAGACGGAGGTACGACGCGGCCGTCGTCGTA 1980
+196 R M S S T A T P R R R Y D A A V V V T T +255
1981 CCACCACCACTGCTAGAGCTGCGGCGGCTGCTGTACGGTTCGCCGCCGCCGCCGCGCAGG 2040
+256 T T T A R A A A A A V T V P A A P P Q A +315
25 2041 CGGGCCGCCGCCGCCGCTGCCACCAAGCAAGCGCGGCCACCCGAGAGGAGGCGCTC 2100
+316 G R R R R C H Q S K R R H P Q R R S R P +375
30 2101 CGGTGTCGGACACCATGGCGGCGCTCATGGCCAAGGGCAAGGTTCTGTATAGTACGCGCGC 2160
+376 V S D T M A A L M A K G K
2161 GTGTCGTCGTCGTTATTTTGCATAGGCGCGGACATACAGTGCTTTAGCTAGCTAACA 2220
2221 GCTAGATCATCGGTGCAGACGGCGTTCATCCCGTACATACCGCCGCGCACCCGACCTA 2280
T A F I P Y I T A G D P D L
2281 CGGACGACGCCGAGGCGCTGCGTCTGCTGGACGGCTGTGGCGCGACGTCATCGAGCTG 2340
A T T A E A L R L L D G C G A D V I E L
35 2341 GGGGTACCCTGCTCGGACCCCTACATCGACGGGCCCATCATCCAGGCGTTCGTTGGCGCGG 2400
G V P C S D P Y I D G P I I Q A S V A R
2401 GCTCTGGCCAGCGCACCATGGACGCGTGTGGAGATGCTGAGGGAGGTGACGCCG 2460
A L A S G T T M D A V L E M L R E V T P
40 2461 GAGCTGTGTCGCCCCGTGGTGTCTCTCTACTACAAGCCCATCATGTCTCGCAGCTTG 2520
E L S C P V V L L S Y Y K P I M S R S L
521 GCCGAGATGAAAGAGGCGGGGTCCACGGTAACATAGCTAGCTCTTCCGATCCCCCTTC 2580
A E M K E A G V H
2581 AATTAATTAATTTATAGTAGTCCATTATGTGATGATTTTGTCTTTTCTTTTACTGACA 2640
2641 GGTCTTATAGTGCTGATCTCCCGTACGTGGCCGCGCACTCGCTGTGGAGTGAAGCCAAG 2700
G L I V P D L P Y V A A H S L W S E A K
45 2701 AACAAACAACCTGGAGCTGGTAGGTTGAATTAAGTTGATGCATGTGATGATTTATGTAGCT 2760
N N N L E L
2761 AGATCGAGCTAGCTATAATTAGGAGCATATCAGGTGCTGCTGACAACACCAGCCATACCA 2820
V L L T T P A I P
50 2821 GAAGACAGGATGAAGGAGATCACCAGGCTTCAGAAGGCTTCGCTACCTGGTAGTTATA 2880
E D R M K E I T K A S E G F V Y L

2881 TGTATATATAGATGGACGACGTAACCTATTCCAGCCCCATGCATATATGGAGGCTTCAAT 2940
 2941 TCTGCAGAGACGACGAAGACACGACGACGACTAACACTAGCTAGGGCGGTACGTTGCAG 3000
 3001 GTGAGCGTGAACGGAGTGACAGGTCTCGCGCAACGTAACCCACGAGTGGAGTCACTC 3060
 V S V N G V T G P R A N V N P R V E S L
 5
 3061 ATCCAGGAGGTTAAGAAGGTGACTAACAAGCCCGTTGCTGTTGGCTTCGGCATATCCAAG 3120
 I Q E V K K V T N K P V A V G F G I S K
 3121 CCCGAGCACGTGAAGCAGGTACGTACGTAGCTGACCAAAAAAACTGTTAACAAGTTTTC 3180
 P E H V K
 3181 TTTGACAAGCCCGCTACTAGCTAGCTAACAGTGATCAGTGACACACACACACACAGAT 3240
 Q I
 10
 3241 TCGCAGTGGGGCGCTGACGGGGTGATCATCGGCAGCGCCATGGTGAGGCAGCTGGGCGA 3300
 A Q W G A D G V I I G S A M V R Q L G E
 3301 AGCGGCTTCTCCCAAGCAAGCCCTGAGGAGGCTGGAGGAGTATGCCAGGGGCATGAAGAA 3360
 A A S P K Q G L R R L E E Y A R G M K N
 15
 3361 CGCGCTGCCATGAGTCCATGACAAAGTAAACGTAACAGACACTTGATAATATCTATCT 3420
 A L P
 3421 ATCATCTCGGAGAAGACGACCGACCAATAAAAAATAAGCCAAGTGAAGCTTAGCT 3480
 3481 GTATATACACCGTACGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 3540
 3541 AACGTGTACGTAGTAGTATGTAATGCATGGAGTGTGGAGTACTAGCTAGCTGGCCGTTTC 3600
 3601 ATTTCGATTATAATCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 3660
 20
 3661 CGAAGAAGCTGGCTAGCTAGCCGCTCTCGATCGTATATGTACTGATTAATCTGCAGATTGA 3720
 \$
 3721 ATAAAACTACAGTACCGCATATGATGCGGTACGTACGTGCTGTATAGTTTGTGCTCATATAT 3780
 3781 GCTCCTCATACCTGCTGATCTGCCCCATCGATCTCTCTGCTACTCCTTCCTGTTAAATG 3840
 3841 CCTTCTTTGACAGACACACCACACAGCAGTACGCTCTGCACGCCGCGCTTTAA 3900
 3901 GACATGTAAGATATTTTAAAGGTTAAGATACCAAGGAGCACAAATCTGGAGCACTGGG 3960
 3961 ATATTGCAAGACAAAAAATAAATTAAGTCCCAACCAAGTAGAGATAGTAAAGA 4020
 4021 GGTGGATGGATTAAATATCTCATGATTTTGGATCTGCTCAAAATAGATCGATATGGTA 4080
 4081 TTCAGATCTATGTTGTATAGCCTTTTCATTAGCTTTCTGAAAAAATAAGTATGATGAG 4140
 141 TCGGGAGTAGCTAGGGCTGTGAAGGAGTCGGATGGGCTTCCACGTACTTGTGTGGGCC 4200
 01 TAGTCCGGTCTATTTAGGTCCGATCCGAGTCCGGCATGGTCCGGTTCATACGGGCTAG 4260
 4261 GACCAAGCTCGGCAGGTGAGTTTATGGCCCGTCCGGCTAGCCCGAGCACGACCGGTTTTTA 4320
 4321 AACTGGCTAGGACTCGCCCATTTAATAAGACAAACATTGCAAAAAATAGCTCTATTTTTT 4380
 4381 ATTTAAATATATTTGTTTATTTGTGAATGTGTATTTTGTAAATATATATTATGTATA 4440
 4441 TAGTTATATCTTCAATTATGATTTAATAATATGTTTTTATTATGAACCTCAATTTAAGT 4500
 30
 4501 TTGATTTATGCGTTGGCGGGCTCGAGGAGGCACGGTGAACATTTTGGGTGCGGCTTAAC 4560
 4561 GGGTCGGCCCGGCGCGGTTCCGCCATCCACGGCCCATCCCGTGTGCGGCTCGTTCCGGTG 4620
 4621 AGTTTCAGCCCGTCCGACAAACCGTCCCGGCGCGGATAAATTAATCGGGCCTAACCGTGGC 4680
 4681 GTGCTTAAACGGTCCGTGCCTCAACGGACCGGCGCGGCGGCGGCGGCTTTGACATCTCTA 4740
 4741 TGGGTGTGATTAGAGATGGCGATGGGAACCGATCACTGATTCCGTTGGAGAATTCGATA 4800
 4801 TCAAGCTTATCGATACC 4817

12. Фрагмент ДНК по п.5, отличающийся тем, что указанный промотор обеспечивает специфическую для пыльцы экспрессию, и содержит последовательность, представленную на фигуре 35

TTAGTACACCTCTCCAAATCGCTTGGGTGGCACATCTTAGCTTTTATCACATTTAAGAAATAGAGTTCACCACTTC 80
 AAAATATGCCTATACAATGAATGATGCTTGGATGCAATATAGCTAGATTCACTAGCTATATATGGTCAATAGAACCCTG 160
 TSAGCACCTCACAAACAGGACTTCAATTTTGAGACCTAAGCGAGTAAATGGTTAAAGTCTCTTATTATTAGTCTTAGG 240
 ACTTCTCCTTGCTAAATGCTTGTGACGGATCTATATATCTTCCCACTGCGGGAGATACTATATATAGGCTTGGACCT 320
 45
 CTAGGGTATCTCAAAGGCTAGTCACAACAATTCTCAACAGTATTTAATTTTATACATGTATGAACAGTGTAGGAATTTG 400
 GTGCCCAACCAAGAGTGGGAGGTGTAATTTGGGTAGCTAAACTAAATAGGGCTCTTCTTATTAGGTTTATCTAGTC 480

560
TCTACTTAGACTAATTCAGAAAGAATTTTACAACCTATGGTTAATCATATCTCTAGTCTAAGCAAATTTAGGAAAGTTAA

640
AAGCACACAATTAGGCACATGTGAAGATGTGTATGGTAAGTAAAGACTTATAAGGAAAAAGTGGGTGAATCCTCAAGA

720
TGTGGTGGTATATCCCAATGATATTAGATGCCAGAATATAGGGGGGAAATCGATGTATACCATCTCTACCAGGATACCTG

800
TGGGACTGTGCAACTGACACATGGACCATGGTGTCTTCTTAGATTGGTTATTAGCTAATTGCGCTACAACCTGTTCAA

880
GGCTAGACCAAAATTAATAAATAATATTAACATAAAAGTTAGGCAAACTATAGTAAATATGCAGCGATCCAACAACA

960
TCCATGTCTCGTGGGTGATGAGCCACGCGTCGCCATACACCCACATGATGTTTCCATACGGATGGTCCTTATGCAATT

1040
TTGTCTGCAAAACACAAGCCTTAATACAGCCACGCGACAATCATGGAAGTGGTCGTTTTAGGTCCTCATCATGAAGTTCA

1120
GGGAAACGCATCAATGTAATGCAGAGAAATGGTATTTCTTCTTTGTAATCAGGGAGAGGAGTACCATCAGTACAGA

EcoRI

1200
TTCAGAAATCAGAAATTCAGTCTTCCAACGACAATAATCGCAGCATCTTGTAATAATTTGCAGAACTTCTGTTTGAATTTGT

1280
AGCCCTGACCTTTGCAAAATTTTGAAGTTGTGCTGCTGACACAACCTCAATCTGGAAGTGTGTTGATCAGTTTTGCCA

1360
GAAACAGCAAGCAGCCTATATATCTGTACGAGACACCTGCCGCCCTCTTCTTCCGCCATTCCCTCCCTACCCCTT

XbaI

1440
CAAAATCTAGAAACCTTTTTTTTTCTCCGATACGCCCTCCATCTCTGCCGTTTCATGTCCGTGGCTGGCTGCCCTCC

mRNA (TAPT)

1520
GTGGGAGCAGGCGGCGCACTCGTTCCCGCGCGAGCCATGGGCCAGTGTGCTCCAAGGGCGCCGGAGAGGCCCCGCCA

3KOH 1

1600
CCGAGGCGCCAAACGGCAGGCGCCAGCCGCGGCGTCCGCGAACAACGCCGACGGACAACGGGCGTCTGCTCGTCCGC

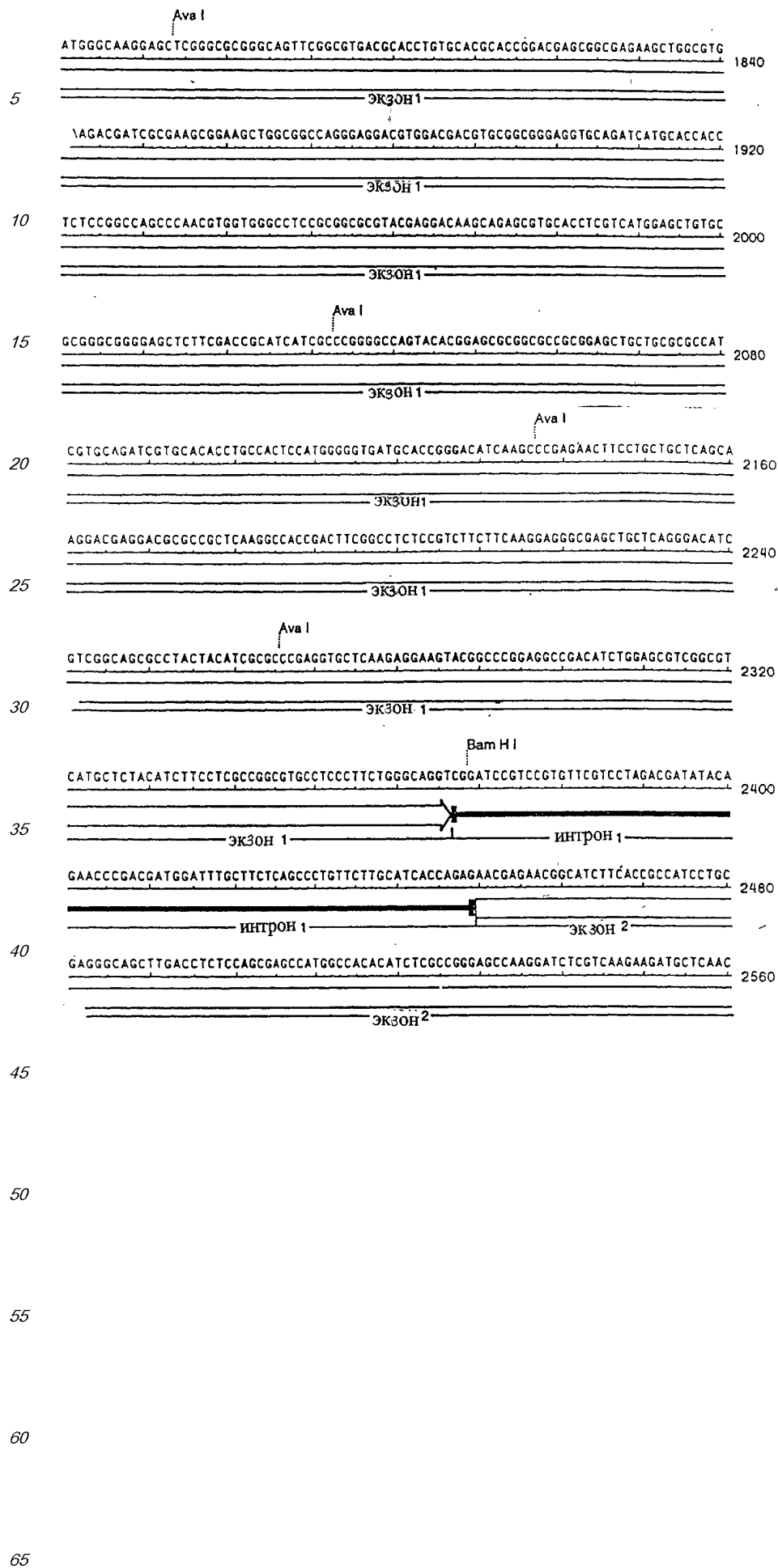
3K3OH 1

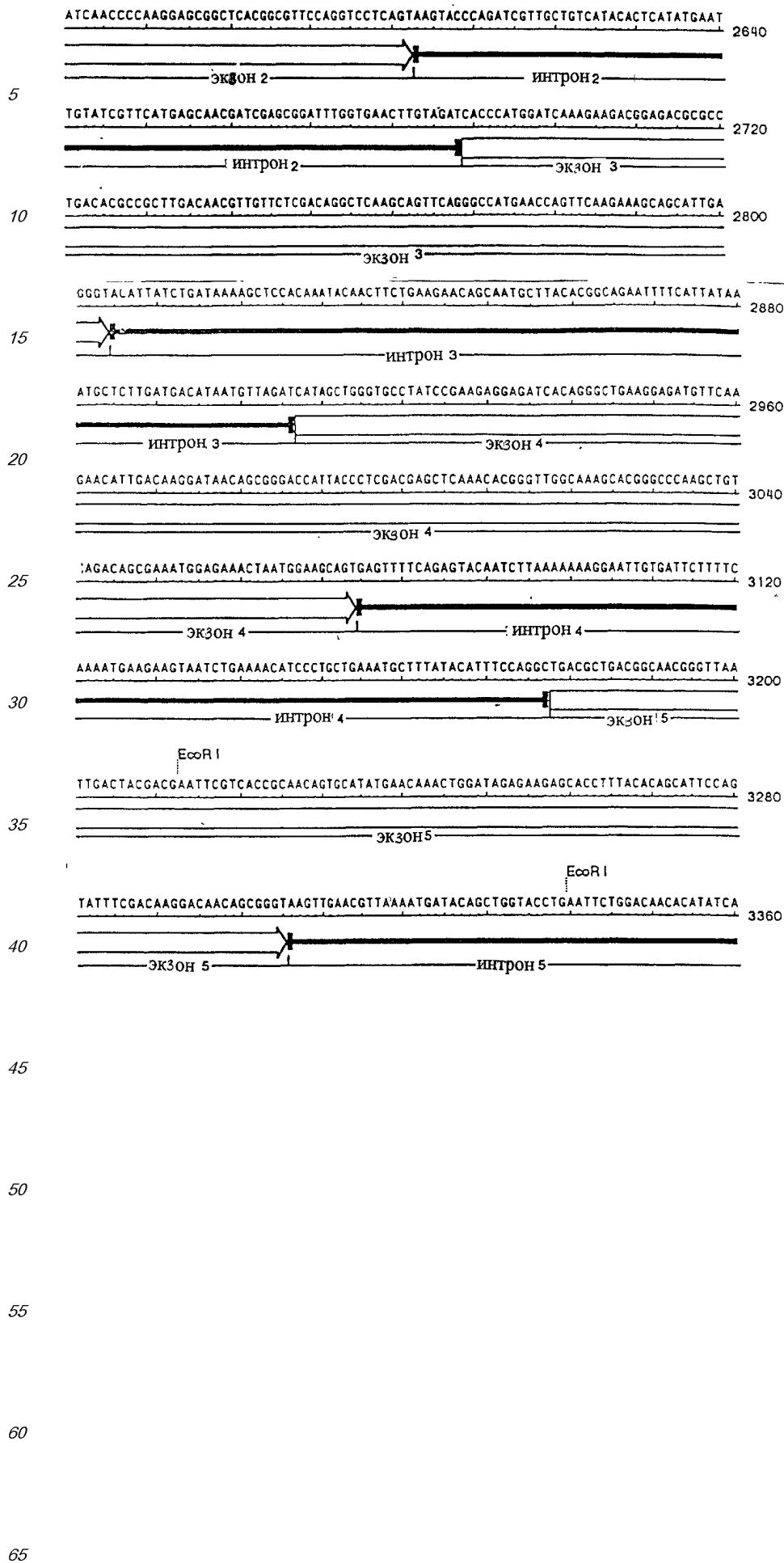
1680
GGTGGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCCGCTGGTGGTGGCGGCGGACGACGAAGCCGGCTCACCCACCGGCGGCGCCAGGG

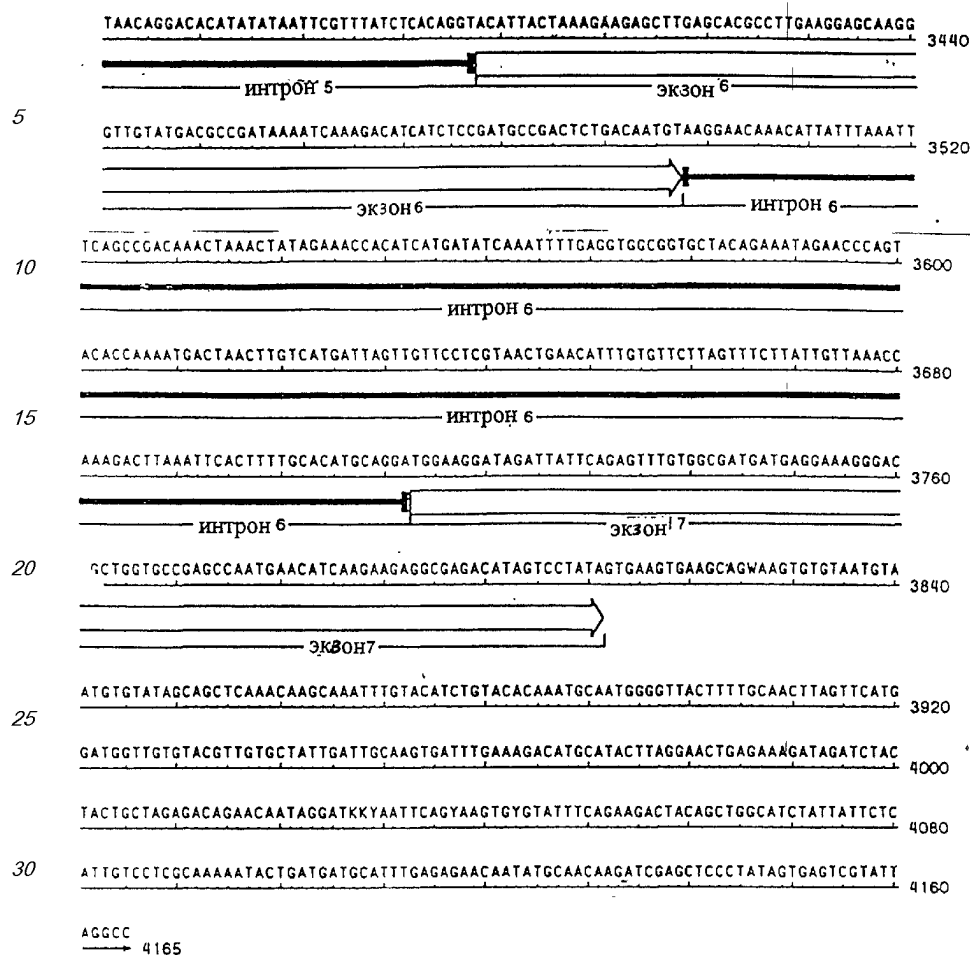
3K3OH 1

1760
CCAGCTCCGGCAGCAAAACCGGCGGCGGCGTGGGACGGTGTGGGCGGCGCCATGGAGGACGTGCGCGGACCTACTCG

3K3OH 1







13. Фрагмент ДНК по п. 5, отличающийся тем, что дополнительно включает второй промотор, обеспечивающий направленную экспрессию связанной с ним кодирующей последовательности в растительной клетке, операбельно связанный с еще одной последовательностью, как описано в любом из пп. 5- 12.
14. Фрагмент ДНК по п.13, отличающийся тем, что указанная вторая кодирующая последовательность является оптимизированной для кукурузы последовательностью, которая кодирует инсектицидный протеин.
15. Фрагмент ДНК по п. 14, отличающийся тем, что указанная вторая кодирующая последовательность кодирует протеин *Bacillus thurengensis* (B.t.).
16. Фрагмент ДНК по п. 15, отличающийся тем, что указанная вторая кодирующая последовательность кодирует CryIA(b) протеин.
17. Фрагмент ДНК по п. 13, отличающийся тем, что указанная вторая кодирующая последовательность является маркерным геном.
18. Фрагмент ДНК, обеспечивающий направленную предпочтительную для сердцевины стебля экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, и содержащий последовательность, представленную на фигуре 24.
19. Фрагмент ДНК, обеспечивающий специфическую для пыльцы экспрессию связанного с ней структурного гена в растении, и содержащий последовательность, представленную на фигуре 35.
20. Рекombинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность по п. 18 или п. 19, операбельно связанную со структурным геном, кодирующим инсектицидный протеин.
21. Рекombинантная молекула ДНК по п. 20, отличающийся тем, что указанный структурный ген представляет собой последовательность, которая кодирует инсектицидный протеин по любому из пп. 1-17.
22. Способ получения оптимизированной для кукурузы кодирующей последовательности инсектицидного протеина по любому из пп. 1-4, включающий обнаружение аминокислотной последовательности заранее определенного инсектицидного протеина и изменение кодирующей последовательности протеина за счет замены соответствующих нативных кодонов на кодоны, которые наиболее предпочтительны для кукурузы.
23. Способ защиты растений кукурузы по меньшей мере от одного насекомого-вредителя, включающий стабильную трансформацию растения кукурузы по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью по любому из пп. 1-17, или рекombинантной молекулой ДНК по п. 20 или 21, где кодирующая последовательность кодирует инсектицидный протеин, за счет чего трансформированное растение кукурузы экспрессирует инсектицидный протеин в количестве, достаточном для защиты растения от насекомого-вредителя.
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что инсектицидные протеины экспрессируются в количестве, достаточном для борьбы с чешуекрылыми или жесткокрылыми насекомыми-вредителями.
25. Способ по п. 23, отличающийся тем, что инсектицидный протеин экспрессируется в количестве, достаточном для борьбы с насекомыми, выбранными из группы, состоящей из мотылька кукурузного, огневки

сахарного тростника, совки, бабочки, походных червей, листоедов, проволочника и тлей.

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

5 27. Способ по п. 23, отличающийся тем, что протеин B.t. является CryIA(b) протеином.

28. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанный промотор является тканеспецифическим или тканепредпочтительным.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 1

BTHKURHD	10	20	30	40	50	60
flsynbt.fin	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCTTATAATTGTTTAAAGTAACCCCTGAA					
bssyn	C....C....C....C....C....G....C....C....C....CC.G....C....G					
	70	80	90	100	110	120
BTHKURHD	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTG					
flsynbt.fin	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
bssyn	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
BTHKURHD	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTGTGTTAGGACTA					
flsynbt.fin	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C..G..C..G					
bssyn	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C..G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
BTHKURHD	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTTGTAACAATT					
flsynbt.fin	..G..C..C..C....C..C..C..C..AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
bssyn	..G..C..C..C....C..C..C..C..AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
BTHKURHD	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
flsynbt.fin	..G...C.G..C....GC.C..C..G..G.....CC.C....G....CAGCC.CC.G					
bssyn	..G...C.G..C....GC.C..C..G..G.....CC.C....G....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
BTHKURHD	GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAATCTTTTAGAGAGTGGAAGCAGAT					
flsynbt.fin	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
bssyn	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
BTHKURHD	CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCC					
flsynbt.fin	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
bssyn	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
	430	440	450	460	470	480
BTHKURHD	CTTACAACCGCTATTCTCTTTTGCAGTTCAAAATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA					
flsynbt.fin	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
bssyn	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
BTHKURHD	TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTGGACAA					
flsynbt.fin	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
bssyn	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
BTHKURHD	AGGTGGGGATTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT					
flsynbt.fin	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					
bssyn	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 1 (продолжение)

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

Фиг. 1 (продолжение)

	2400	2410	2420	2430	2440	2450
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCATTTCCTCCTGGACATTGATGTTGGATGTACAGACTTAAATGAGGACTTAGGTGTAT					
ssyn	.C..C...AG.C.....C..C..G..C..C..C...C.G..C.....C.G..C..G.					
	2460	2470	2480	2490	2500	2510
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGGTGATATTCAAGATTAAGACGCAAGATGGCCATGCAAGACTAGGAAATCTAGAATTTTC					
ssyn	C.....C.....C..G..C.....C..CC.C..G..C..C..G..C..C.					
	2520	2530	2540	2550	2560	2570
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCGAAGAGAAACCATTAGTAGGAGAAAGCACTAGCTCGTGTGAAAAGAGCGGAGAAAAAT					
ssyn	.G..G.....G..CC.G..G..C..G..C..G..C..C.....GC.C..C.....G..G.					
	2580	2590	2600	2610	2620	2630
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGAGAGACAAACGTGAAAAATTGGAATGGGAAACAAATATTGTTTATAAAGAGGCAAAAG					
ssyn	..C.C.....G..C..G..GC...G.....G..C..C..C..G..C..G.....C..G.					
	2640	2650	2660	2670	2680	2690
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AATCTGTAGATGCTTTATTTGTAAACTCTCAATATGATAGATTACAAGCGGATACCAACA					
ssyn	.GAGC..G..C..CC.G..C..G...AGC..G..C..CC.CC.G..G..C..C.....					
	2700	2710	2720	2730	2740	2750
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCGCGATGATTCATGCGGCAGATAAAGCGGTTTCATAGCATTGAGAAAGCTTATCTGCCTG					
ssyn	C.....C..C..C..C..C..G.....G..C.....C..G..C..C.....C.					
	2760	2770	2780	2790	2800	2810
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGCTATTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTT					
ssyn	AGC.....C..C..C..G..C..C..C..C..C..G..GC.G..G..C..C..C..C.					
	2820	2830	2840	2850	2860	2870
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAGAAATGTCATTAAAAATGGTGATTTTAATAATG					
ssyn	C..C...AG...G..C..C..CC.C..C..G..C..G..C..C..C..C..C..C.					
	2880	2890	2900	2910	2920	2930
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GCTTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAAACAACCACCGTT					
ssyn	..C.GAG.....G..C..C..G..C..G..G..G.....CA					
	2940	2950	2960	2970	2980	2990
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGGTCCTTGTGTTCCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTCAAGAAGTTTCGTGTCTGTCCGG					
ssyn	GC..G..G..G..G..C..G....G..C..G...AGC..G..G..G..C..G..C..C..C.					

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 1 (продолжение)

	3000	3010	3020	3030	3040	3050
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGCGTACAAGGAGGGATATGGAGAAGGTTGCGTAA					
ssyn	.C..C.....C.....G..C..G..C.....C..C..C..G..C.....G.					

	3060	3070	3080	3090	3100	3110
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CCATTCATGAGATCGAGAACAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGTGTAGAAGAGG					
ssyn	C..C.....C..C.....G..C.....C.....C..G..G....					

	3120	3130	3140	3150	3160	3170
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AAGTATATCCAAACAACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGCGACTCAAGAAGAATATG					
ssyn	.G..G..C..C.....C..G..C..C..C..C..C..C..C..G..G..G..C.					

	3180	3190	3200	3210	3220	3230
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGGGTACGTACACTTCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTG					
ssyn	C..C.....CAGC..C..C..C..C.....C.....C..G.....CAGCAGC.					

	3240	3250	3260	3270	3280	3290
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TACCAGCTGATTATGCATCAGCCTATGAAGAAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACA					
ssyn	.G..C..C..C..C..C..CAGC.....C..G..G..G..C..C..C..C..CC.C....					

	3300	3310	3320	3330	3340	3350
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCCTTGTGAATCTAACAGAGGATATGGGGATTACACACCACTACCAGCTGGCTATGTGA					
ssyn	.C..C..C..GAGC...C..C..C..C..C.....C..C..G..C..C.....C....					

	3360	3370	3380	3390	3400	3410
BT HKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CAAAAGAATTAGAGTACTTCCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGG					
ssyn	.C..G..GC.G.....C..G.....C.....G.....C.....C..G..C.					

	3420	3430	3440	3450	3460	
BT HKURHD	*	*	*	*	*	
flsynbt.fin	AAGGAACATTCATCGTGGACAGCGTGAATTACTTCTTATGGAGGAATAA					
ssyn	.G..C..C.....GC.G..G..G.....G..G					
					...TG..G	

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 2 (продолжение)

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

Фиг. 2 (продолжение)

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

Фиг. 2 (продолжение)

	1440	1450	1460	1470	1480	1490
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCTTAAGGACCAGGATTACAGGAGGAGATATTC .C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C..C.					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TTCAAGAAGAACTTCACCTGGCCAGATTCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT .G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
-	1560	1570	1580	1590	1600	1610
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACCACAAATTTACAATTCCATACAT GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGAGGAGTA GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATG .CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	GATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG .CAGC..C..G..C..CC.G..C..C..C..G....CAGC.....C..G..G..C..C.					
	1800	1810	1820	1830	1840	1850
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAAGTAACCTTTGAGCCAGAAATATGATTTAGAAAGAG .C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..C..CC.G..G..G.					
	1860	1870	1880	1890	1900	1910
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CACAAAAGGCCGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAATCAAATCGGGTTAAAAACAGATG .T..G.....C.....C.....C..CAGCAG...C..G.....CC.G..G..C..C.					
	1920	1930	1940			
BTHKURHD	*	*	*			
bssyn	TGACGGATTATCATATTGATCAAGTATCC C..C..C..C..C.....G..G..AG					

UA 48104 C2

Фиг. 3

	10	20	30	40	50	60
syn1T.mze	ATGGACAACAACCCCAACATCAACGAGTGCATCCCCCTACAACCTGCCTGAGCAACCCCGAG					
bssyn						
synful.mod						
	70	80	90	100	110	120
syn1T.mze	GTGGAGGTGCTGGGCGGCGAGCGCATCGAGACCGGCTACACCCCATCGACATCAGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	130	140	150	160	170	180
syn1T.mze	AGCCTGACCCAGTTCCTGCTGAGCGAGTTCGTGCCCCGGCGCCGGCTTCGTGCTGGGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	190	200	210	220	230	240
syn1T.mze	GTGGACATCATCTGGGGCATCTTCGGCCCCAGCCAGTGGGACGCCTTCCTGGTGCAGATC					
bssyn						
synful.mod						
	250	260	270	280	290	300
syn1T.mze	GAGCAGCTGATCAACCAGCGCATCGAGGAGTTCGCCCCGCAACCAGGCCATCAGCCGCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	310	320	330	340	350	360
syn1T.mze	GAGGGCCTGAGCAACCTGTACCAGATCTACGCCGAGAGCTTCGCGAGTGGGAGGCCGAC					
bssyn	A.....					
synful.mod	A.....					
	370	380	390	400	410	420
syn1T.mze	CCCACCAACCCCGCCCTGCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCC					
bssyn						
synful.mod						
	430	440	450	460	470	480
syn1T.mze	CTGACCACCGCCATCCCCCTGTTGCGCGTGCAGAACTACCAGGTGCCCTGCTGAGCGTG					
bssyn						
synful.mod						
	490	500	510	520	530	540
syn1T.mze	TACGTGCAGGCCGCCAACCTGCACCTGAGCGTGCTGCGCGACGTGAGCGTGTTCGGCCAG					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	550	560	570	580	590	600
syn1T.mze	CGCTGGGGCTTCGACGCGGCCACCATCAACAGCCGCTACAACGACCTGACCCGCCTGATC					
bssyn						
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

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

Фиг. 3 (продолжение)

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
syn1T.mze	TACCGCAAGACGGGCACCGTGGACAGCCTGGACGAGATCCCCCCCCCAGAACAAACGCTG					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
syn1T.mze	CCCCCCCCCGCCAGGGCTTCAGCCACCGCCTGAGCCACGTGAGCATGTTCCGCAGCGGCTTC					
bssyn	..A..T..A.....T.....T.....					
synful.mod	..A..T..A.....T.....T.....					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
syn1T.mze	AGCAACAGCAGCGTGAGCATCATCCGCGCCCCCATGTTTCAGCTGGATCCACCGCAGCGCC					
bssyn	T..A..T.....T.....T...					
synful.mod	T..A..T.....T.....T...					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
syn1T.mze	GAGTTCAACAACATCATCCCCAGCAGCCAGATCAGCCAGATCCCCCTGACCAAGAGCACC					
bssyn						
synful.mod						
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
syn1T.mze	AACCTGGGCAGCGGCACACAGCGTGGTGAAGGGCCCCGGCTTCACCGGCGGCGACATCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
syn1T.mze	CGCCGCACACAGCCCCGGCCAGATCAGCACCCCTGCGCGTGAACATCACCGCCCCCTGAGC					
bssyn						
synful.mod						
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
syn1T.mze	CAGCGCTACCGCGTGCGCATCCGCTACGCCAGCACCACCAACCTGCAGTTCCACACCAGC					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
syn1T.mze	ATCGACGGCGCCCCCATCAACCAGGGCAACTTCAGCGCCACCATGAGCAGCGGCAGCAAC					
bssyn						
synful.mod						
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
syn1T.mze	CTGCAGAGCGGCAGCTTCGCGACCCGTGGGCTTCACCACCCCTTCAACTTCAGCAACGGC					
bssyn						
synful.mod						
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
syn1T.mze	AGCAGCGTGTTCAACCCTGAGCGCCCCACGTGTTCAACAGCGGCAACGAGGTGTACATCGAC					
bssyn						
synful.mod						

Фиг. 3 (продолжение)

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

Фиг. 3 (продолжение)

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

Фиг. 3 (продолжение)

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

Фиг. 4

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

Фиг. 4 (продолжение)

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

Фиг. 4 (продолжение)

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

Фиг. 4 (продолжение)

	1800	310	1820	1830	1840
BTHKURHD	*	*	*	*	*
PMONBT	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATA-----				
bssyn	.C..T.....G.....G..T..C.....T.....C.....T..G..-----				
	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..CGACCTGGAGAGGG				
BTHKURHD	-----				
PMONBT	-----				
bssyn	CTCAGAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCCACCAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACC				
BTHKURHD	-----T				
PMONBT	-----C				
bssyn	TGACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG				

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 5

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

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 5 (продолжение)

MC	740	750	760	770	780
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	TTGGACATTGTGTCTCTCTTCCCGAACTATGACTCCAGAACCTACCCTATCCGTACAGTG				
	C.....C...AGC..G.....C.....C...AG.C.C.....C.....C...C...				
MC	790	800	810	820	830
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	TCCCAACTTACCAGAGAAATCTATACTAACCAGTTCTTGAGAACTTCGACGGTAGCTTC				
	AG...G..G...C.C..G..T..C..C.....C..G..G.....C.....C.....				
MC	850	860	870	880	890
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	CGTGGTTCTGCCCAAGGTATCGAAGGCTCCATCAGGAGCCCACACTTGATGGACATCTTG				
	..C..CAGC.....G..C.....G...AG....C.C.....C...C.....C...				
MC	910	920	930	940	950
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	AACAGCATAACTATCTACAGCGATGCTCACAGAGGAGACTATTACTGGTCTGGACACCAG				
	C..C.....C...C..C...C.C..C.....C.....AGC..C.....				
MC	970	980	990	1000	1010
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	ATCATGGCCTCTCCAGTTGGATTTCAGCGGGCCCGAGTTTACCTTTCTCTATGGAAC				
	AGC..C..C..C.....C.....C.....C..C..G..C..C..C				
MC	1030	1040	1050	1060	1070
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGGAAACGCGCTCCACAACAACGTATCGTTGCTCAACTAGGTCAGGGTGTCTACAGA				
	C.....T..A..T..G..G..C.....G..A..G..G..C.....A..G...C.C				
MC	1090	1100	1110	1120	1130
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	ACCTTGCTCTCCACCTTGTACAGAAGACCCCTTCAATATCGGTATCAACAACCAGCAACTT				
	...C..AGCAG....C.....C.TC....T.....C.....C.....G..G				
MC	1150	1160	1170	1180	1190
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	TCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTTCGCTATGGAACCTCTTCTAACTTGCCATCCGCTGTT				
	AG...G..G.....C..C.....C..C...AGCAGC...C....CAG...C..G				
MC	1210	1220	1230	1240	1250
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	TACAGAAAAGAGCGGAACCGTTGATTCTTGGACGAAATCCCACCACAGAACAACAATGTG				
	...C.C.....C.....G..CAG.C.....G.....C..T.....C...				
MC	1270	1280	1290	1300	1310
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	CCACCCAGGCAAGGATTCTCCACAGGTTGAGCCACGTGTCCATGTTCCGTTCCGGATTC				
	TC.A..G..C...AG....C.TC.....AG.....CAGT..C...				
MC	1330	1340	1350	1360	1370
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	AGCAACAGTTCCGTGAGCATCATCAGAGCTCCTATGTTCTCATGGATTTCATCGTAGTGCT				
	CAG.....C.T..A.....AGC.....C..C.....C				
MC	1390	1400	1410	1420	1430
PMONBT	*	*	*	*	*
bssyn	GAGTTCAACAATATCATTCCTTCTCTCAAATCACCCAAATCCCATTGACCAAGTCTACT				
	C.....C..CAG.AGC..G.....G.....CC.....AGC..C				

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 5 (продолжение)

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	AACCTTGGATCTGGAACTTCTGTCGTGAAAAGGACCAGGCTTCACAGGAGGTGATATTCTT					
bssyn	G..CAGC..C..CAGC..G.....G..C..C.....C..C..C..C..G					
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	AGAAGAACTTCTCCTGGCCAGATTAGCACCCCTCAGAGTTAACATCACTGCACCACTTTCT					
bssyn	C.CC.C..CAGC..C.....C.....GC.C..G.....C..C..C..GAGC					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	CAAAGATATCGTGTCAAGGATTCGTTACGCATCTACCACTAACTTGCAATTCCACACCTCC					
bssyn	..GC.C..C..C..C..C..C..C.....CAGC.....C...C....G.....AG.					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	ATCGACGGAAGGCCTATCAATCAGGGTAACTTCTCCGCAACCATGTCAAGCGGCAGCAAC					
bssyn	CC.C..C.....C.....AG...C.....AGC.....					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	TTGCAATCCGGCAGCTTCAGAACCGTCGGTTTCACTACTCCTTCAACTTCTCTAACGGA					
bssyn	C....GAG.....C.C.....G..C.....C..C..C.....AGC.....C					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	*	*	*	*	*	*
PMONBT	TCAAGCGTTTTTACCCTTAGCGCTCATGTGTTCAATTCTGGCAATGAAGTGTACATTGAC					
bssyn	AGC.....G.....G.....C..C.....CAGC.....C..G.....C...					
	1810	1820	1830	1840		
	*	*	*	*		
PMONBT	CGTATTGAGTTTGTGCTTCCGGAAGTTACCTTCGAGGCTGAGTA-----					
bssyn	..C..C.....C.....C..G..G.....C.....CGACCTGGAGAGGGCT					
PMONBT	-----					
bssyn	CAGAAGGCCGTGAACGAGCTGTTACCAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACGTG					
PMONBT	-----C					
bssyn	ACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG					

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

64 ATGGACCTGC TGCCCGACGC CCGCATCGAG GACAGCCTGT GCATCGCCGA GGGCAACAAC
MetAspLeu LeuProAsp AlaArgIleGlu AspSerLeu CysIleAla GluGlyAsnAsn

124 ATCGACCCCT TCGTGAGCGC CAGCACCGTG CAGACCGGCA TCAACATCGC CGGCCGCATC
IleAspPro PheValSer AlaSerThrVal GlnThrGly IleAsnIle AlaGlyArgIle

184 CTGGGCGTGC TGGGCGTGCC CTTCGCCGGC CAGCTGGCCA GCTTCTACAG CTTCCTGGTG
LeuGlyVal LeuGlyVal ProPheAlaGly GlnLeuAla SerPheTyr SerPheLeuVal

244 GCGGAGCTGT GGCCCCGCGG CCGCGACCAG TGGGAGATCT TCCTGGAGCA CGTGGAGCAG
GlyGluLeu TrpProArg GlyArgAspGln TrpGluIle PheLeuGlu HisValGluGln

304 CTGATCAACC AGCAGATCAC CGAGAACGCC CGCAACACCG CCCTGGCCCG CCTGCAGGGC
LeuIleAsn GlnGlnIle ThrGluAsnAla ArgAsnThr AlaLeuAla ArgLeuGlnGly

364 CTGGGCGACA GCTTCCGCGC CTACCAGCAG AGCCTGGAGG ACTGGCTGGA GAACCGCGAC
LeuGlyAsp SerPheArg AlaTyrGlnGln SerLeuGlu AspTrpLeu GluAsnArgAsp

424 GACGCCCCGA CCCGCAGCGT GCTGTACACC CAGTACATCG CCCTGGAGCT GGACTTCCTG
AspAlaArg ThrArgSer ValLeuTyrThr GlnTyrIle AlaLeuGlu LeuAspPheLeu

484 AACGCCATGC CCCTGTTCCG CATCCGCAAC CAGGAGGTGC CCCTGCTGAT GGTGTACGCC
AsnAlaMet ProLeuPhe AlaIleArgAsn GlnGluVal ProLeuLeu MetValTyrAla

544 CAGGCCGCCA ACCTGCACCT GCTGCTGCTG CCGACGCCA GCCTGTTCCG CAGCGAGTTC
GlnAlaAla AsnLeuHis LeuLeuLeuLeu ArgAspAla SerLeuPhe GlySerGluPhe

604 GGCCTGACCA GCCAGGAGAT CCAGCGCTAC TACGACGCC AGGTGGAGCG CACCCGCGAC
GlyLeuThr SerGlnGlu IleGlnArgTyr TyrGluArg GlnValGlu ArgThrArgAsp

664 TACAGCGACT ACTGCGTGA GTGGTACAAC ACCGCCTGA ACAGCCTGCG CGGCACCAAC
TyrSerAsp TyrCysVal GluTrpTyrAsn ThrGlyLeu AsnSerLeu ArgGlyThrAsn

724 GCCGCCAGCT GGGTGCGCTA CAACCACTTC CGCCGCGACC TGACCCTGGG CGTGCTGGAC
AlaAlaSer TrpValArg TyrAsnGlnPhe ArgArgAsp LeuThrLeu GlyValLeuAsp

784 CTGGTGGCCC TGTTCCCCAG CTACGACACC CGCACCTACC CCATCAACAC CAGCGCCCAG
LeuValAla LeuPhePro SerTyrAspThr ArgThrTyr ProIleAsn ThrSerAlaGln

844 CTGACCCCG AGGTGTACAC CGACGCCATC GCGCCACCG GCGTGAACAT GGCCAGCATG
LeuThrArg GluValTyr ThrAspAlaIle GlyAlaThr GlyValAsn MetAlaSerMet

904 AACTGGTACA ACAACAACGC CCCAGCTTC AGCGCCATCG AGGCCGCGGC CATCCGCAGC
AsnTrpTyr AsnAsnAsn AlaProSerPhe SerAlaIle GluAlaAla AlaIleArgSer

964 CCCACCTGC TGGACTTCCT GGAGCAGCTG ACCATCTTCA GCGCCAGCAG CCGCTGGAGC
ProHisLeu LeuAspPhe LeuGluGlnLeu ThrIlePhe SerAlaSer SerArgTrpSer

1024 AACACCCGCC ACATGACCTA CTGGCGCGGC CACACCATCC AGAGCCGCCC CATCGGCGGC
AsnThrArg HisMetThr TyrTrpArgGly HisThrIle GlnSerArg ProIleGlyGly

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 6 (продолжение)

1084 GGCCTGAACA CCAGCACCCA CGGCGCCACC AACACCAGCA TCAACCCCGT GACCCTGCGC
 GlyLeuAsn ThrSerThr HisGlyAlaThr AsnThrSer IleAsnPro ValThrLeuArg
 1144 TTCGCCAGCC GCGACGTGTA CCGCACCGAG AGCTACGCCG GCGTGCTGCT GTGGGGCATC
 PheAlaSer ArgAspVal TyrArgThrGlu SerTyrAla GlyValLeu LeuTrpGlyIle
 1204 TACCTGGAGC CCATCCACGG CGTGCCCAACC GTGCGCTTCA ACTTCACCAA CCCCAGAAC
 TyrLeuGlu ProIleHis GlyValProThr ValArgPhe AsnPheThr AsnProGlnAsn
 1264 ATCAGCGACC GCGGCACCGC CAACTACAGC CAGCCCTACG AGAGCCCCGG CCTGCAGCTG
 IleSerAsp ArgGlyThr AlaAsnTyrSer GlnProTyr GluSerPro GlyLeuGlnLeu
 1324 AAGGACAGCG AGACCGAGCT GCGCCCCGAG ACCACCGAGC GCCCCAACTA CGAGAGCTAC
 LysAspSer GluThrGlu LeuProProGlu ThrThrGlu ArgProAsn TyrGluSerTyr
 1384 AGCCACCGCC TGAGCCACAT CGGCATCATC CTGCAGAGCC GCGTGAACGT GCGCGTGATC
 SerHisArg LeuSerHis IleGlyIleIle LeuGlnSer ArgValAsn ValProValTyr
 1444 AGCTGGACCC ACCGCGCGC CGACCGCACC AACACCATCG GCCCCAACCG CATCACCCAG
 SerTrpThr HisArgSer AlaAspArgThr AsnThrIle GlyProAsn ArgIleThrGln
 1504 ATCCCCATGG TGAAGGCCAG CGAGCTGCCC CAGGGCACCA CCGTGGTGCG CGGCCCCGGC
 IleProMet ValLysAla SerGluLeuPro GlnGlyThr ThrValVal ArgGlyProGly
 1564 TTCACCGGCG GCGACATCCT GCGCCGCACC AACACCGGCG GCTTCGGCCC CATCCGCGTG
 PheThrGly GlyAspIle LeuArgArgThr AsnThrGly GlyPheGly ProIleArgVal
 1624 ACCGTGAACG GCGCCCTGAC CCAGCGCTAC CGCATCGGCT TCCGCTACGC CAGCACCGTG
 ThrValAsn GlyProLeu ThrGlnArgTyr ArgIleGly PheArgTyr AlaSerThrVal
 1684 GACTTCGACT TCTTCGTGAG CCGCGGCGGC ACCACCGTGA ACAACTTCCG CTTCCTGCGC
 AspPheAsp PhePheVal SerArgGlyGly ThrThrVal AsnAsnPhe ArgPheLeuArg
 1744 ACCATGAACA GCGCGACGA GCTGAAGTAC GGCAACTTCG TCGCGCCGCG CTTCACCACC
 ThrMetAsn SerGlyAsp GluLeuLysTyr GlyAsnPhe ValArgArg AlaPheThrThr
 1804 CCCTTCACCT TCACCCAGAT CCAGGACATC ATCCGCACCA GCATCCAGGG CCTGAGCGGC
 ProPheThr PheThrGln IleGlnAspIle IleArgThr SerIleGln GlyLeuSerGly
 1864 AACGGCGAGG TGTACATCGA CAAGATCGAG ATCATCCCCG TGACCGCCAC CTTCGAGGCC
 AsnGlyGlu ValTyrIle AspLysIleGlu IleIlePro ValThrAla ThrPheGluAla
 1924 GAGTACGACC TGGAGCGCGC CCAGGAGGCC GTGAACGCCC TGTTACCAA CACCAACCCC
 GluTyrAsp LeuGluArg AlaGlnGluAla ValAsnAla LeuPheThr AsnThrAsnPro
 1984 CGCCGCCTGA AGACCGACGT GACCGACTAC CACATCGACC AGGTGAGCAA CCTGGTGGCC
 ArgArgLeu LysThrAsp ValThrAspTyr HisIleAsp GlnValSer AsnLeuValAla
 2044 TGCCTGAGCG ACGAGTTCTG CCTGGACGAG AAGCGCGAGC TGCTGGAGAA GGTGAAGTAC
 CysLeuSer AspGluPhe CysLeuAspGlu LysArgGlu LeuLeuGlu LysValLysTyr

2104 GCCAAGCGCC TGAGCGACGA GCGCAACCTG CTGCAGGACC CCAACTTCAC CAGCATCAAC
AlaLysArg LeuSerAsp GluArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPhe ThrSerIleAsn

2164 AAGCAGCCCG ACTTCATCAG CACCAACGAG CAGAGCAACT TCACCAGCAT CCACGAGCAG
LysGlnPro AspPheIle SerThrAsnGlu GlnSerAsn PheThrSer IleHisGluGln

2224 AGCGAGCACG GCTGGTGGGG CAGCGAGAAC ATCACCATCC AGGAGGGCAA CGACGTGTTT
SerGluHis GlyTrpTrp GlySerGluAsn IleThrIle GlnGluGly AsnAspValPhe

2284 AAGGAGAACT ACGTGACCCT GCCCGGCACC TTCAACGAGT GCTACCCAC CTACCTGTAC
LysGluAsn TyrValThr LeuProGlyThr PheAsnGlu CysTyrPro ThrTyrLeuTyr

2344 CAGAAGATCG GCGAGAGCGA GCTGAAGGCC TACACCCGCT ACCAGCTGCG CGGCTACATC
GlnLysIle GlyGluSer GluLeuLysAla TyrThrArg TyrGlnLeu ArgGlyTyrIle

2404 GAGGACAGCC AGGACCTGGA GATCTACCTG ATCCGCTACA ACGCCAAGCA CGAGACCCTG
GluAspSer GlnAspLeu GluIleTyrLeu IleArgTyr AsnAlaLys HisGluThrLeu

2464 GACGTGCCCG GCACCGAGAG CCTGTGGCCC CTGAGCGTGG AGAGCCCAT CGGCCGCTGC
AspValPro GlyThrGlu SerLeuTrpPro LeuSerVal GluSerPro IleGlyArgCys

2524 GGCGAGCCCA ACCGCTGCGC CCCCCACTTC GAGTGGAAACC CCGACCTGGA CTGCAGCTGC
GlyGluPro AsnArgCys AlaProHisPhe GluTrpAsn ProAspLeu AspCysSerCys

2584 CGCGACGGCG AGAAGTGCGC CCACCACAGC CACCACTTCA GCCTGGACAT CGACGTGGGC
ArgAspGly GluLysCys AlaHisHisSer HisHisPhe SerLeuAsp IleAspValGly

2644 TGCACCGACC TGCACGAGAA CCTGGGCGTG TGGGTGGTGT TCAAGATCAA GACCCAGGAG
CysThrAsp LeuHisGlu AsnLeuGlyVal TrpValVal PheLysIle LysThrGlnGlu

2704 GGCCACGCCC GCCTGGGCAA CCTGGAGTTC ATCGAGGAGA AGCCCCTGCT GGGCGAGGCC
GlyHisAla ArgLeuGly AsnLeuGluPhe IleGluGlu LysProLeu LeuGlyGluAla

2764 CTGAGCCGCG TGAAGCGCGC CGAGAAGAAG TGGCGCGACA AGCGCGAGAA GCTGCAGCTG
LeuSerArg ValLysArg AlaGluLysLys TrpArgAsp LysArgGlu LysLeuGlnLeu

2824 GAGACCAAGC GCGTGACAC CGAGGCCAAG GAGGCCGTGG ACGCCCTGTT CGTGGACAGC
GluThrLys ArgValTyr ThrGluAlaLys GluAlaVal AspAlaLeu PheValAspSer

2884 CAGTACGACC GCCTGCAGGC CGACACCAAC ATCGGCATGA TCCACGCCGC CGACAAGCTG
GlnTyrAsp ArgLeuGln AlaAspThrAsn IleGlyMet IleHisAla AlaAspLysLeu

2944 GTGCACCGCA TCCGCGAGGC CTACCTGAGC GAGCTGCCCC TGATCCCCCG CGTGAACGCC
ValHisArg IleArgGlu AlaTyrLeuSer GluLeuPro ValIlePro GlyValAsnAla

3004 GAGATCTTCG AGGAGCTGGA GGGCCACATC ATCACCGCCA TCAGCCTGTA CGACGCCCGC
GluIlePhe GluGluLeu GluGlyHisIle IleThrAla IleSerLeu TyrAspAlaArg

Фиг. 6 (продолжение)

3064 AACGTGGTGA AGAACGGCGA CTTCAACAAC GGCCTGACCT GCTGGAACGT GAAGGGCCAC
AsnValVal LysAsnGly AspPheAsnAsn GlyLeuThr CysTrpAsn ValLysGlyHis

3124 GTGGACGTGC AGCAGAGCCA CCACCGCAGC GACCTGGTGA TCCCCGAGTG GGAGGCCGAG
ValAspVal GlnGlnSer HisHisArgSer AspLeuVal IleProGlu TrpGluAlaGlu

3184 GTGAGCCAGG CCGTGC GCGT GTGCCCCGGC TCGGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC
ValSerGln AlaValArg ValCysProGly CysGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr

3244 AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG
LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu

3304 CTGAAGTTCA AGAACCGCGA GGAGGAGGAG GTGTACCCCA CCGACACCGG CACCTGCAAC
LeuLysPhe LysAsnArg GluGluGluGlu ValTyrPro ThrAspThr GlyThrCysAsn

3364 GACTACACCG CCCACCAGGG CACCGCCGGC TCGCGCGACG CCTGCAACAG CCGCAACGCC
AspTyrThr AlaHisGln GlyThrAlaGly CysAlaAsp AlaCysAsn SerArgAsnAla

3424 GGCTACGAGG ACGCCTACGA GGTGGACACC ACCGCCAGCG TGAAC TACAA GCCCACCTAC
GlyTyrGlu AspAlaTyr GluValAspThr ThrAlaSer ValAsnTyr LysProThrTyr

3484 GAGGAGGAGA CCTACACCGA CGTGC GCGC GACAACCACT GCGAGTACGA CCGCGGCTAC
GluGluGlu ThrTyrThr AspValArgArg AspAsnHis CysGluTyr AspArgGlyTyr

3544 GTGAACTACC CCCCCGTGCC CGCCGGCTAC GTGACCAAGG AGCTGGAGTA CTTCCCCGAG
ValAsnTyr ProProVal ProAlaGlyTyr ValThrLys GluLeuGlu TyrPheProGlu

3604 ACCGACACCG TGTGGATCGA GATCGGCGAG ACCGAGGGCA AGTTCATCGT GGACAGCGTG
ThrAspThr ValTrpIle GluIleGlyGlu ThrGluGly LysPheIle ValAspSerVal

3664 GAGCTGCTGC TGATGGAGGA GTAG
GluLeuLeu LeuMetGlu Glu---

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Последовательность полноразмерного гибридного синтетическо/
нативного химерного гена cryIA/в/.
Точка слияния синтетической и нативной кодирующих последова-
тельностью обозначена в последовательности знаком (/).

```

1  ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
   MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
61  GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
   ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCC GGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
   SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
181 GTGGACATCA TCTGGGCGAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
   ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
   GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
   GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
   ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCCTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
   LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGCCGAG
   TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
   ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
   GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCC CCGAGCTGAC CCTGACCGTG
   ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCACCTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
   LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
   SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
   ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
   AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

```

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

U A 4 8 1 0 4 C 2

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

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 7(продолжение)

2881 TTATCCTGCT GGAACGTGAA AGGGCATGTA GATGTAGAAG AACAAAACAA CCACCGTTCC
LeuSerCys TrpAsnVal LysGlyHisVal AspValGlu GluGlnAsn AsnHisArgSer

2941 GTCCTTGTTG TTCCGGAATG GGAAGCAGAA GTGTCACAAG AAGTTCGTGT CTGTCCGGGT
ValLeuVal ValProGlu TrpGluAlaGlu ValSerGln GluValArg ValCysProGly

3001 CGTGGCTATA TCCTTCGTGT CACAGCGTAC AAGGAGGGAT ATGGAGAAGG TTGCGTAACC
ArgGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr

3061 ATTATGAGA TCGAGAACAA TACAGACGAA CTGAAGTTTA GCAACTGTGT AGAAGAGGAA
IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu LeuLysPhe SerAsnCys ValGluGluGlu

3121 GTATATCCAA ACAACACCGT AACGTGTAAT GATTATACTG CGACTCAAGA AGAATATGAG
ValTyrPro AsnAsnThr ValThrCysAsn AspTyrThr AlaThrGln GluGluTyrGlu

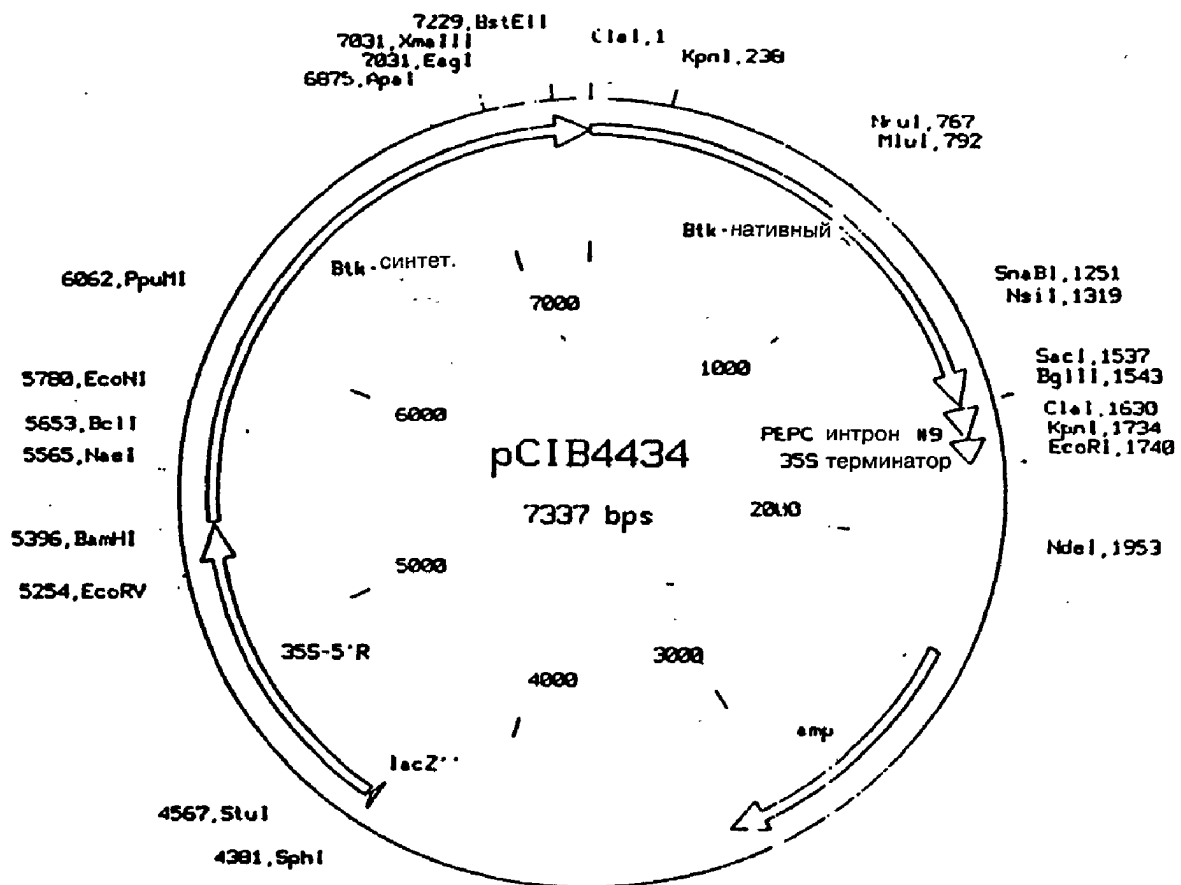
3181 GGTACGTACA CTTCTCGTAA TCGAGGATAT GACGGAGCCT ATGAAAGCAA TTCTTCTGTA
GlyThrTyr ThrSerArg AsnArgGlyTyr AspGlyAla TyrGluSer AsnSerSerVal

3241 CCAGCTGATT ATGCATCAGC CTATGAAGAA AAAGCATATA CAGATGGACG AAGAGACAAT
ProAlaAsp TyrAlaSer AlaTyrGluGlu LysAlaTyr ThrAspGly ArgArgAspAsn

3301 CCTTGTTGAAT CTAACAGAGG ATATGGGGAT TACACACCAC TACCAGCTGG CTATGTGACA
ProCysGlu SerAsnArg GlyTyrGlyAsp TyrThrPro LeuProAla GlyTyrValThr

3361 AAAGAAATAG AGTACTTCCC AGAAACCGAT AAGGTATGGA TTGAGATCGG AGAAACGGAA
LysGluLeu GluTyrPhe ProGluThrAsp LysValTrp IleGluIle GlyGluThrGlu

3421 CGAACATTCA TCGTGGACAG CGTGGAAATTA CTTCTTATGG AGGAATAA
GlyThrPhe IleValAsp SerValGluLeu LeuLeuMet GluGlu---



1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGA
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCT
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCCT
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTC
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTC
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAC
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTC
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTC
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTC
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAC
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTCCCCCT GTACGGCAC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyTh

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1061 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1361 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCGA CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

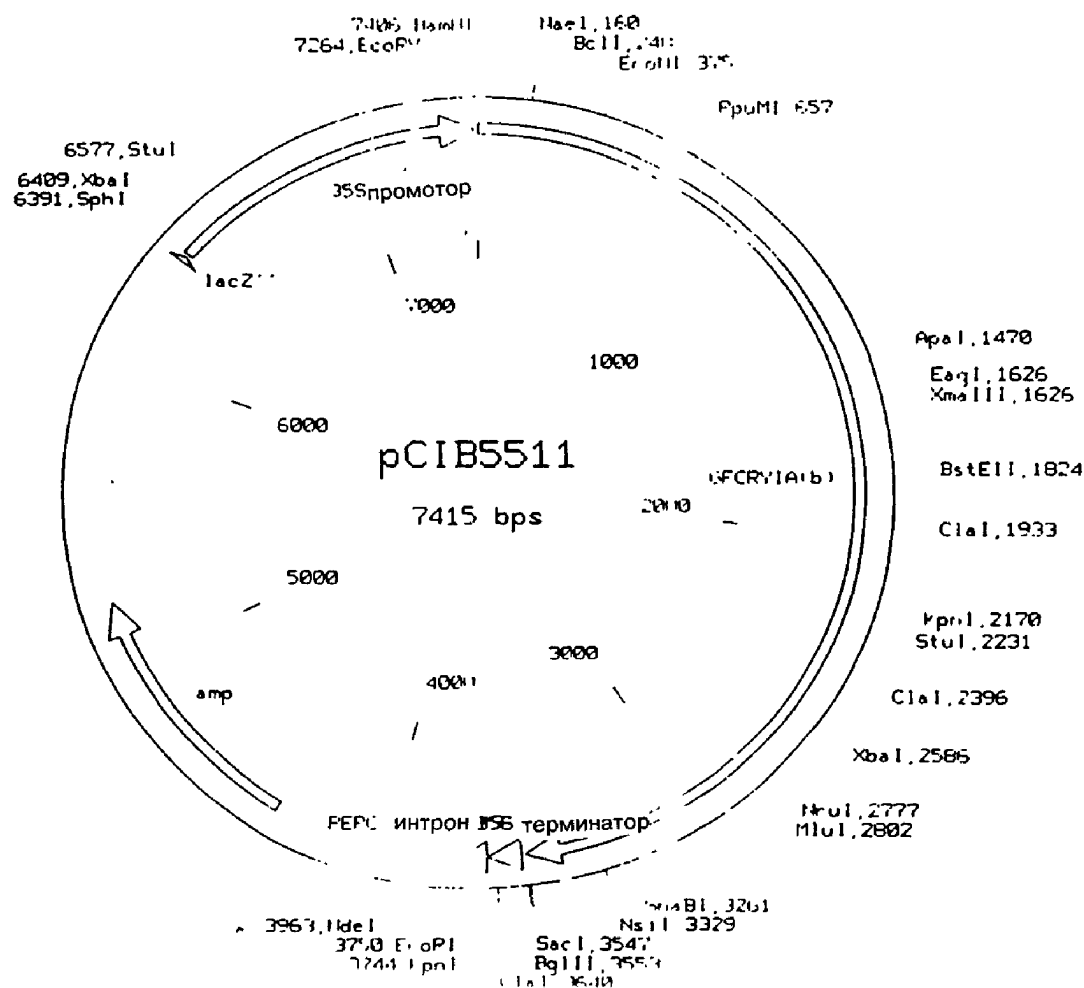
2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGC
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GCGGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTCGA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

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 9 (продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATA
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTATACTGCC
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
3301 GAAAGCAATT CTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGAATTACT TCTTATGGAC
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
3541 GAATAA
312---



1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGA
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProG
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCC
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLe
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCC
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLe
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGAT
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnI
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCC
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLe
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGA
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAs
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAl
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGT
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVa
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCA
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGl
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGAT
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuI
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGG
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGl
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGT
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVa
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGT
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVa
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTT
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPh
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCT
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLe
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCA
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGl
 961 ATCATGGCCA GCCCGTCTCG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCAC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyTh

U A 4 8 1 0 4 C 2

C 2 4 8 1 0 4 U A

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

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

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

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

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

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

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

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

1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC
ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer

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

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

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

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

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

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

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCAGC CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 11(продолжение)

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGC
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GCGGACGACG TGTTCAGGA GAACTACGTG
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 CTGGAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTCAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACCGGTTCA TAGCATTCGA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTGTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 11(продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATA
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCS
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTA
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

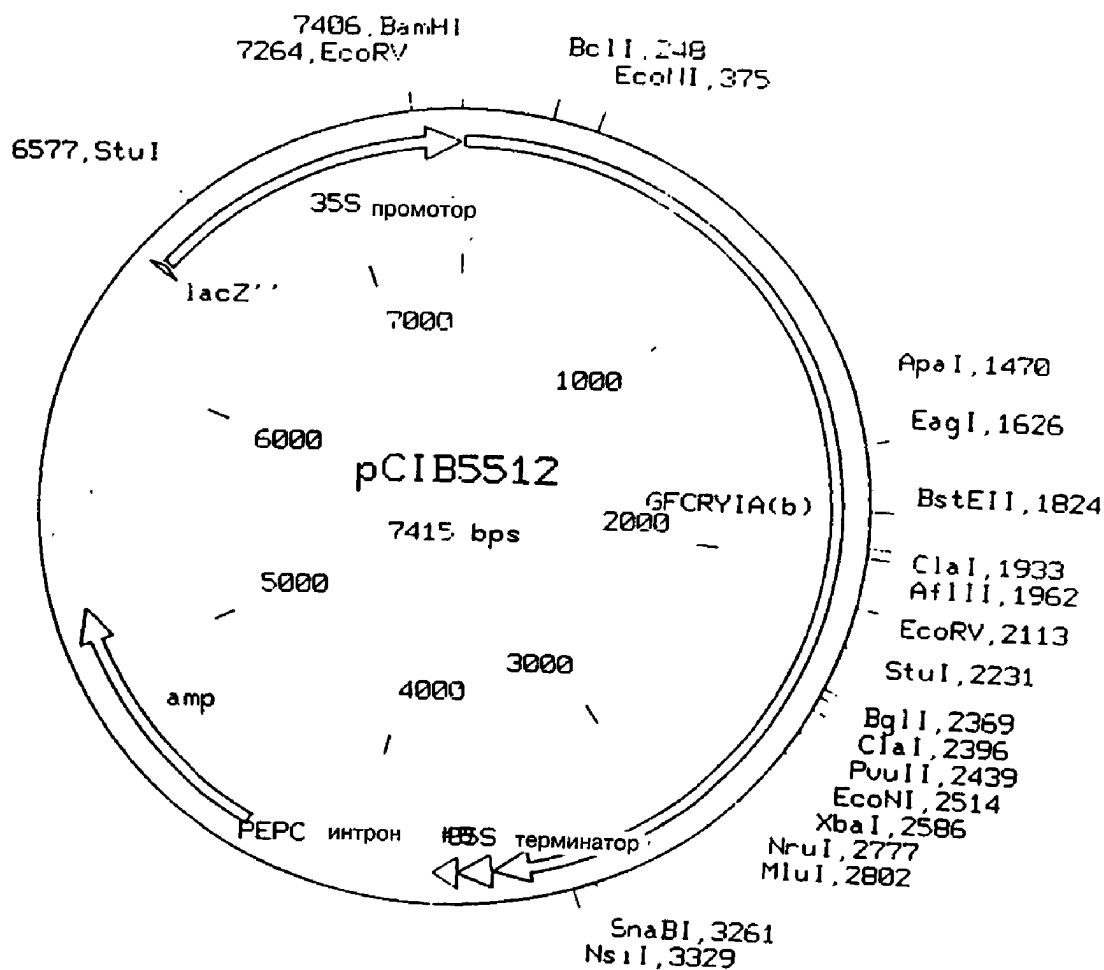
3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAACTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAA
Glu---



1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

U A 4 8 1 0 4 C 2

C 2 4 8 1 0 4 U A

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys

1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCACG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 13(продолжение)

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTr

2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GGCAGCAGCG TGTTCAAGGA GAACTACGT
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVa

2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGA
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGln

2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TGCCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGAGAAC
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AGTTCCTGGA GGAGAAGCCC CTGGTGGCG AGGCCCTGGC CCGCGTGAAG
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2641 CGCGCCGAGA AGAAGTGGCG CGACAAGCGC GAGAAGCTGG AGTGGGAGAC CAACATCGTG
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TACAAGGAGG CCAAGGAGAG CGTGGACGCC CTGTTCTGTA ACAGCCAGTA CGACCGCCTG
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAGGCCGACA CCAACATCGC CATGATCCAC GCCGCCGACA AGCGCGTGCA CAGCATTCCG
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAGGCCTACC TGCCCGAGCT GAGCGTGATC CCCGGCGTGA ACGCCGCCAT CTTGAGGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

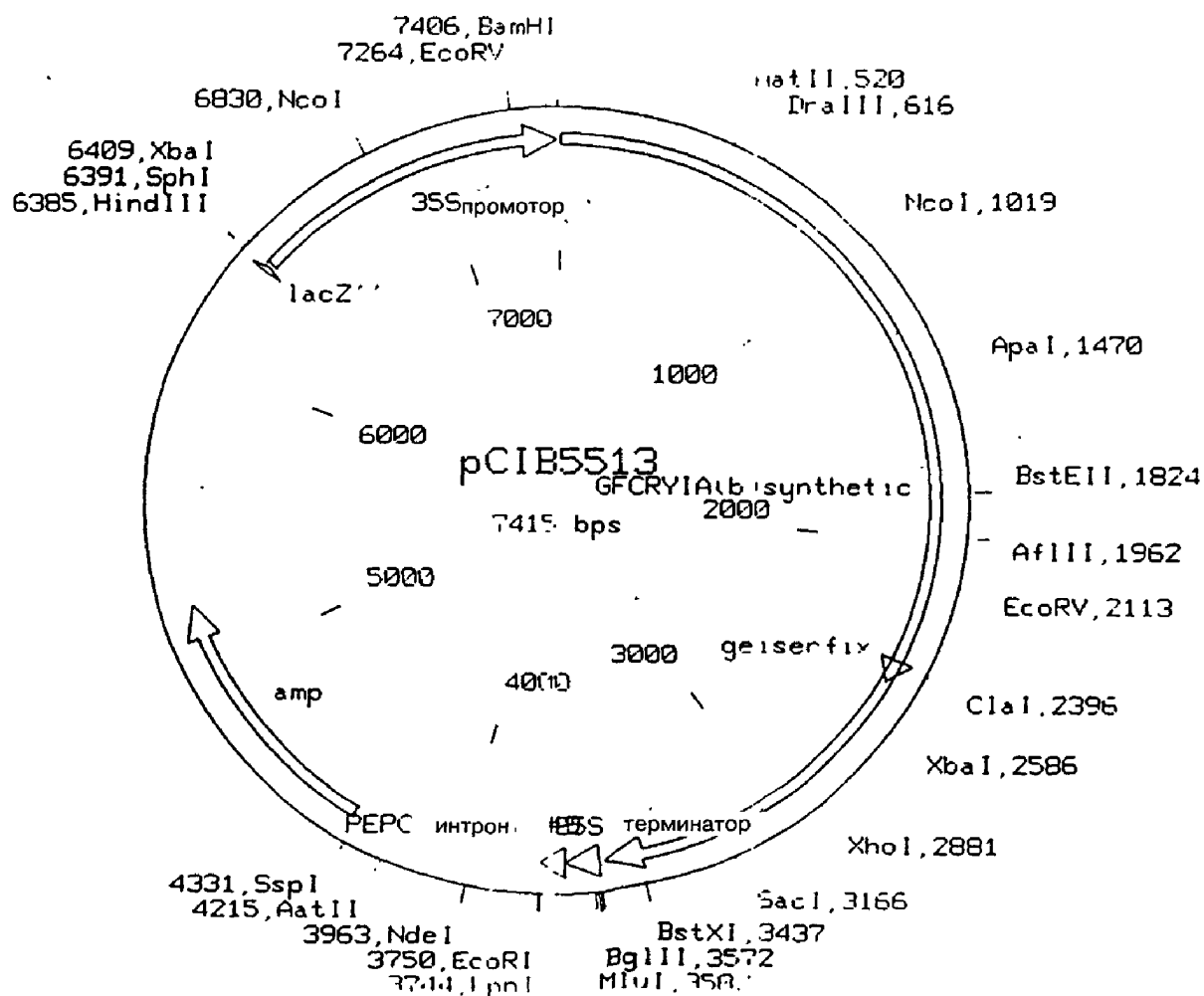
2881 CTCGAGGGCC GCATCTTCAC CGCCTTCAGC CTGTACGACG CCCGCAACGT GATCAAGAAC
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGCGACTTCA ACAACGGCCT GAGCTGCTGG AACGTGAAGG GCCACGTGGA CGTGGAGGAG
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAGAACAACC ACCGCAGCGT GCTGGTGGTG CCCGAGTGGG AGGCCGAGGT GAGCCAGGAG
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

UÄ 48104 C2



1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACGTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCCG GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTGG CTTAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 15 (продолжение)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 15 (продолжение)

2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp

2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal

2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu

2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp

2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr

2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg

2401 TCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys

2461 TGCGCCCACC ACAGCCACCA CTTCAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn

2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu

2581 GGCAATCTAG AATTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCSTGTGAAA
GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal

2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu

2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTGCA
GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg

2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu

2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn

2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu

3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTGTGT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 15 (продолжение)

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCTG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr

3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer

3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTATACTGCC
AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla

3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr

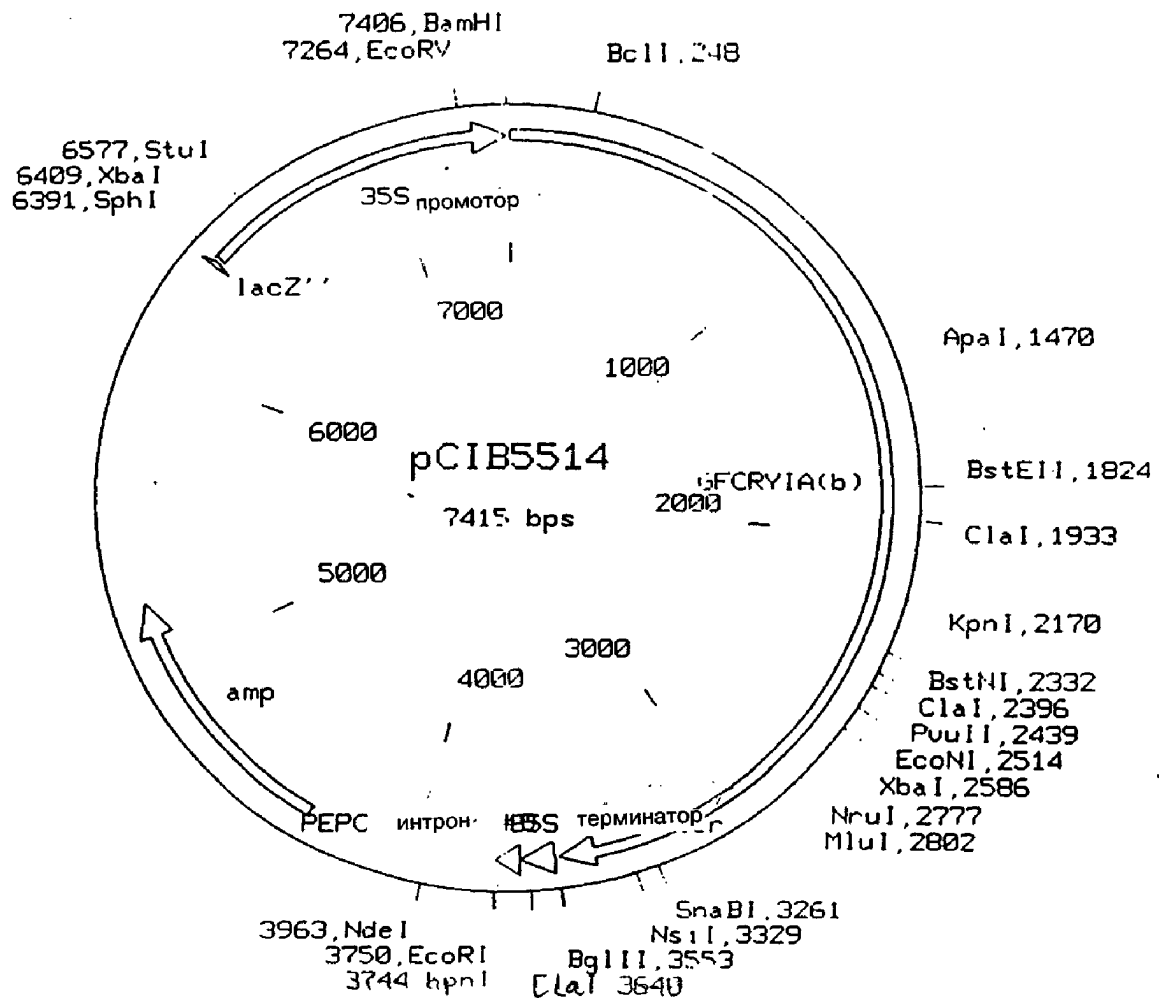
3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr

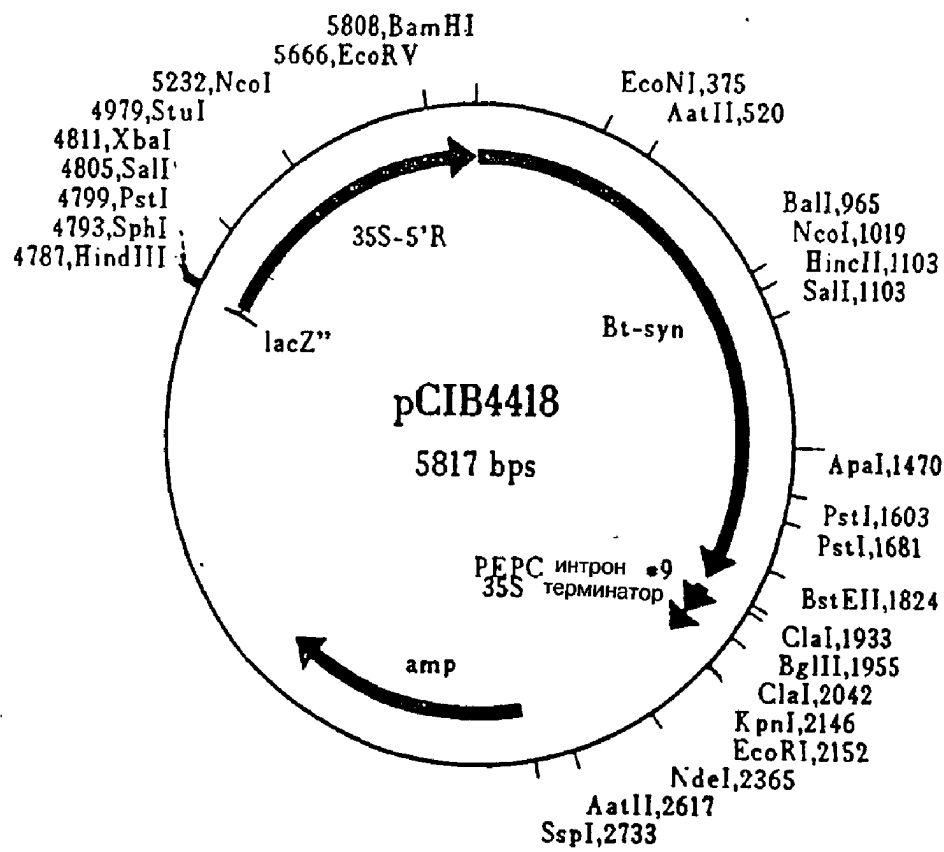
3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu

3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle

3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGGAATTACT TCTTATGGAG
GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu

3541 GAATAAG
Glu---

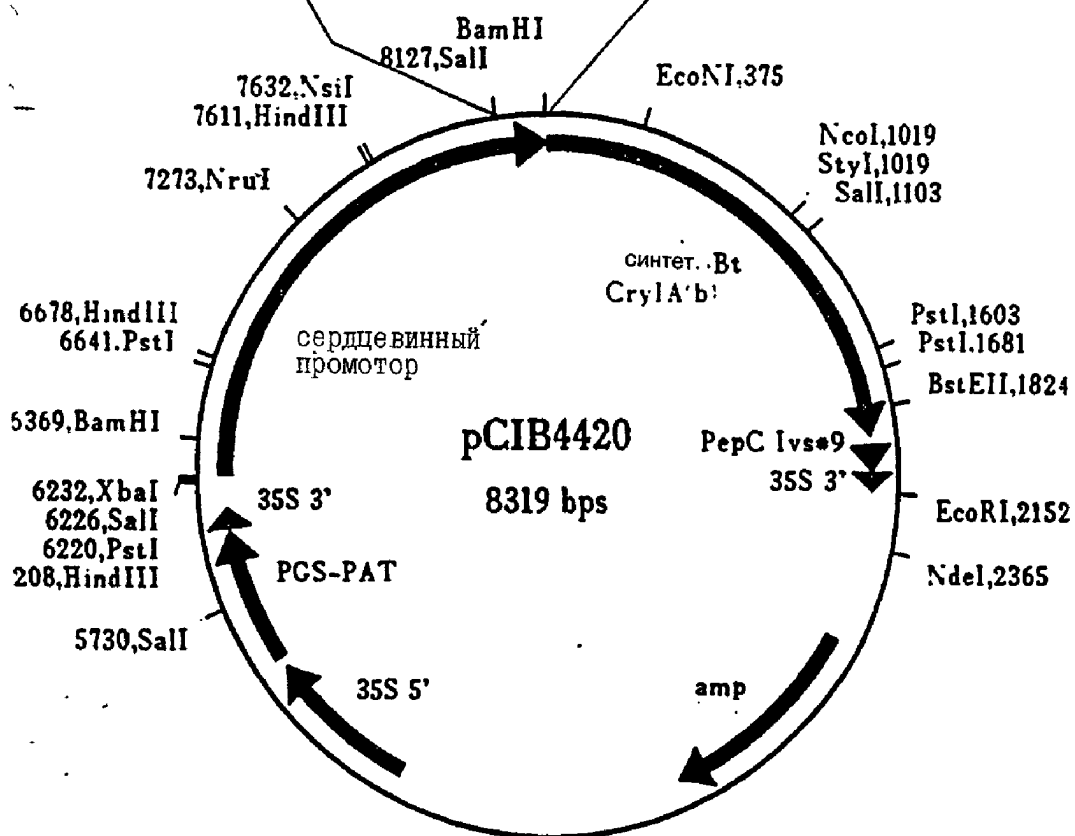


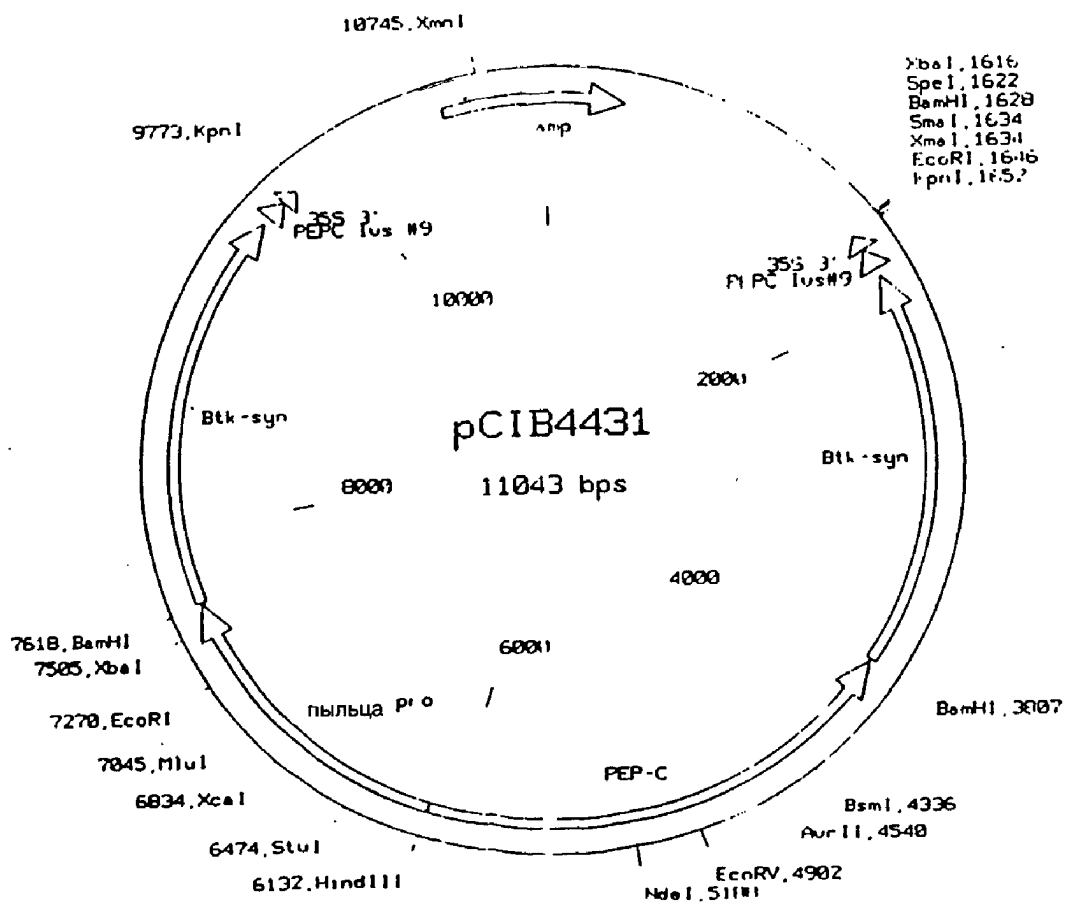
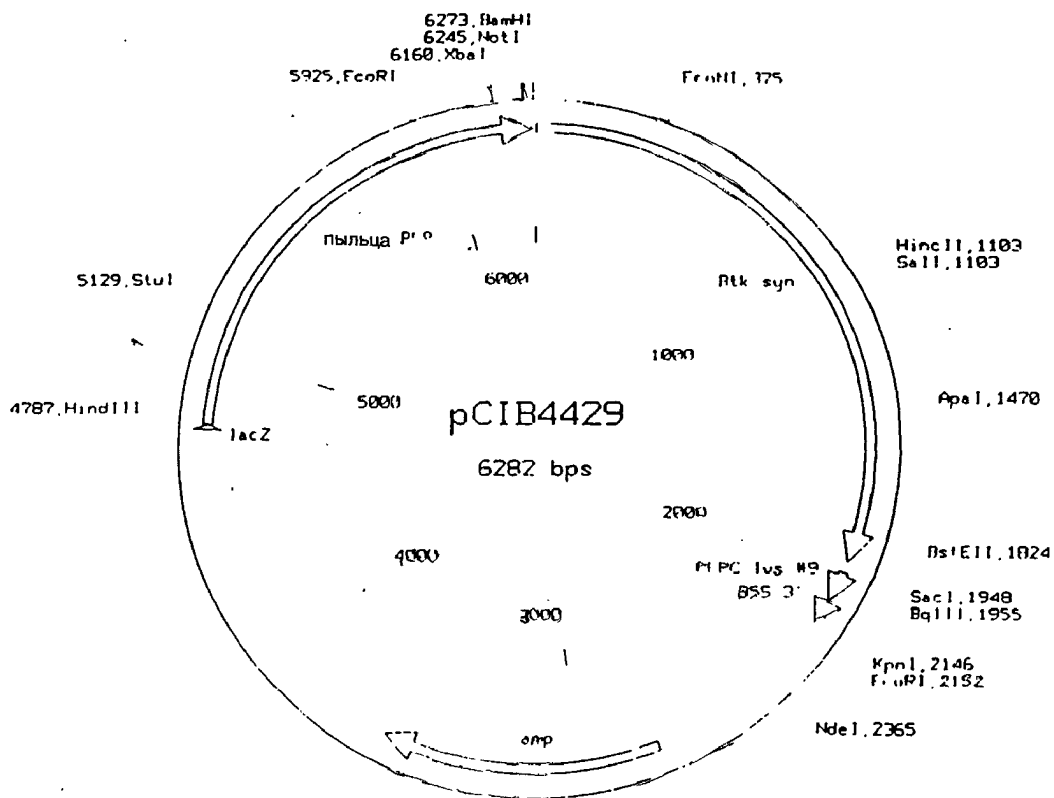


U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Фрагмент PCR, заменяющий сердцевинный Nco I (начало ATG) на Bam HI. сердц-5'-GGATCCAACA(ATG)-3'-syn.-Bt





6212, BamHI
6160, XbaI

EcoRI, 375

5541, NcoI

5129, StuI

4787, HindIII

пыльца pro

6000

Btk -syn

HcoI, 1019

SaII, 1103

ApaI, 1470

BstEII, 1824

SacI, 1948

BglII, 1955

KpnI, 2146

HdeI, 2365

pCIB4428

6221 bps

3000

amp

HindIII, 1

StuI, 341

XbaI, 701

MluI, 914

EcoRI, 1139

BamHI, 1425

10039, NdeI

9753, EcoRV

9391, AvrII

9187, BsmI

8658, BamHI

пыльца pro

PEP C

10000

pcib4430

10962 bps

2000

Btk -syn

Btk -syn

KpnI, 3581

XmnI, 4553

amp

PEP C

пыльца pro

6000

PEP C

пыльца pro

6503, KpnI

6497, EcoRI

6485, XmaI

6485, SmaI

6479, BamHI

Фиг. 23 А

Уровни белка *cryIA/v* в трансгенной кукурузе

Уровни Bt при анализе растений с помощью ELISA

Инбредная линия х родитель № растения нг B, /мг белка

2ND01X171-4A	1646	29
5N984X171-4A	857	1705
5N984X171-4A	870	1760
5N984X171-13	969	22
5N984X171-15	1468	17
5N984X171-15	1470	28
5N984X171-14A	1502	180
5N984X171-14A	1529	1500
5N984X176-11	1667	408
5N984X176-11	1671	1270
5N984X176-11	1673	1522
5N984X176-11	1675	943
5N984X176-11	1679	967
5N984X171-4B	1942	15
5N984X171-4B	1946	16
5NA56X171-16ABX	1101	30
5NA89X176-11	1622	959
5NA89X176-11	1630	1172
5NA89X176-11	1635	1100
6F010X171-4	825	103
6F010X171-4	832	1298

Уровни Bt характеризуются значением нг *cryIA/v* /мг общего белка.
Данные получены от потомства описанных кукурузных трансформантов, экспрессирующих белок *cryIA/v*.
Анализ ELISA трансгенного растительного материала выполняли, используя стандартные методики, описанные в другом месте.

Испытание ECB . *Ostrinia nubilalis*, и точильщика *Diatraea saccharalis*
сахарного тростника

плазмида	Промотор	скрещивание	растение № plant No.	ген: <i>Bt</i>	процент уничтожения <i>Ostrinia</i>	<i>Diatraea</i>
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-88	21	+	100	100
			22		0	0
			40	+	100	100
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-11	95	+	100	100
			96		0	0
			98	+	100	100
pCIB4418	35S	5N984 X 171-14A	45		0	10
			64	+	100	90
			68	+	100	100
pCIB4431	PEPC	2N217AF X 175-88	1	-	0	0
			3	+	100	100
			4	+	100	100
pCIB4418	35S	2N217AF X 171-15	70	-	10	0
			83	+	90	80
			88	+	90	100

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Уровни белка *cryIA(b)* в трансгенной кукурузе

Растения из теплицы

Лист Сердцевина Корень Пыльца

6F010 x 171-4A	409 + 288	NT	NT	NT
5N984 x 171-14A	256 + 159	191	198	30
6F010 x 171-16AB	240 + 174	221	271	NT
5N984 x 171-13	201 + 94	NT	NT	NT
5NA89 x 171-13	37 + 7	150	0	NT
5N984 x 171-18	7.7 + 3	NT	NT	NT
6N615 x 171-16AB	7.5 + 3	0	0	

Линия РЕРС

6N615 x 176-11	1126 + 419	41	19	NT
6F010 x 176-10	774 + 159	NT	NT	130
5N984 x 176-11	719 + 128	16	20	186

Уровни *Bt* характеризуются значением нг *cryIA(b)* /мг общего белка

Данные получены от потомства описанных кукурузных трансформантов, экспрессирующих белок *cryIA(b)*

Анализ *Elisa* трансгенного растительного материала выполняли, используя стандартные методики, описанные в другом месте

Испытание чувствительности сердцевинной кукурузы с синтетическим
Bt к Европейскому кукурузному точильщику, *Ostrinia nubilalis*.

плазмида	промотор	линия	растение №	процент уничтожения
pCIB4433	сердцевина	JS21A-верхушка	1	90
			3	80
			11	90
			13	70
			14	75
			19	85
			28	80
pCIB4433	сердцевина	JS21D средняя часть	3	70
			4	65
			7	85
			17	95
		контроль	1	5
			2	0
			3	0

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Экспрессия гена *sguIA/v/* в трансгенную кукурузу, используя преимущественно сердцевинный промотор

Образцы листьев небольших проростков, трансформированных pCIB4433 при использовании методик, описанных в другом месте, были проанализированы на присутствие белка *sguIA/v/*, используя анализ ELISA. Было обнаружено, что все растения, экспрессирующие *sguIA/v/*, являются инсектицидными в стандартной биопробе на Европейского зернового точильщика.

номер растения	нг <i>sguIA(v)</i> / мг белка
JS21A-1 TOP вер	169
JS21A-2 TOP хушка	0
JS21A-3 TOP -" -	113
JS21A-11 TOP -" -	127
JS21A-12 TOP -" -	112
JS21A-13 TOP -" -	97
JS21A-14 TOP -" -	118
JS21A-19 TOP -" -	82
JS21A-24 TOP -" -	0
JS21A-28 TOP -" -	154
JS22D-3 MID средняя	2946
JS22D-4 MID часть	5590
JS22D-11 MID -" -	215
JS22D-17 MID -" -	3004

Следует отметить, что преимущественно сердцевинный промотор имеет низкий, но обнаруживаемый уровень экспрессии в ткань листа кукурузы. Обнаружение белка *sguIA/v/* согласуется с таким характером экспрессии.

1	GAATTCGGATCCATTAAAGAAGTCTTTGAACAGATTCTAGAGATCTAGTTTAATGAGCTC	60
61	CCAAAAGTCTTGAAAAAATTCAGCGGGGAGGCCATTAGGGCAGGGGTACTGTTATGTTTT	120
121	AAAGAGAACACCACTTTCTTGATCTCTTCTAAAGAGAAATGTTTTGTAAGAAGGATCCTG	180
181	TCCTCCTCATCCAACCTTTTCATCGGCAATTTTCATAGAGATATTAGAGGCAAGAGAG	240
241	GGGCCAAAAAGATCCATGTAAATGGAAGTGGCCACCTGGTTGATACCTCCCTCATCTTCA	300
301	ACAGAAAATCCATTATGAAAAAGTGAATGGATTTTAACTCTTCTTTTCTTCCCTTTTG	360
361	CAATGAGCTGAAAAATATCTGGTATTATTCTCATCACCTCATTAAATGAATCTGTCCCTAG	420
421	CAATTTGCTTTCTCTTGATCCCTTCTGCGCCACCATGTTTCTTAAATTCCACTCCATAT	480
481	CAAGCTTTTCCAATCTATCAGAATCTGAGATGGCTGCAATCTCTCTCATTTTCTCAAGGA	540
541	TATCGATGTTATCCATAAGGTATTTCTTGAATCTTTATATTTCCCTTCGACATTTATAT	600
601	TCCATCCTTTCAACATTTTTTTTGTTCATCTTTTTTGTTTTTTTCCTTTCCAAACATCGA	660
661	TACATTTCTGCTCCTCACAGGTAAGGACGAGCTTTCAAAAAACCTTCTGCTTTAAAGTC	720
721	AGGTCTGAGCCTCCAGCAAAGCTCACATATCTAAAGTCCCTCTCTTAGTTGGGACAGAG	780
781	TCAGTGCTAAGACACATGGGAACATGACCAGAAAAAAAATCATATTTAGCCCAGAGAC	840
841	AACAATATTCTTGTACTGCAAGTCTCGTTATGGGCTAGCAAAGGAATCTACCCAACTTCT	900
901	CAAATGTGTTGGGATGTCAAGTATATAGACTATTTCATCAGTTCCAACTCTATCAAACGTG	960
961	GCAGCTCAATTATAGAGTTGAATAAAGTGCTCCATCTATTTGTTCTTATCCTCATATTTG	1020
1021	GTTAAGATATTAAATCACCTCCCACCAACATTTAAAGTGCACCATTTAAAGTGGCTCGC	1080
1081	GAGCACCAACCGCTGAAAACCGGAAATGTTTAGCACGTTGGCAGCGGGACCCCTTTTCTA	1140
1141	TCTCATCGTGTCTTCGTTGTCCACCACGGCCACGGGCCAACGCTCCTCCATCCTGTAG	1200
1201	TGTAGAGTATATTCCATTTGCGACCGAGCCGAGCATCGATCCAGCCACACTGGCCACTGC	1260
84		
1261	CAGCCAGCCATGTGGCACTCCTACGTATACTACGTGAGGTGAGATTCACTCACATGGGAT	1320
-465		-405
1321	GGGACCGAGATATTTTACTGCTGTGGTTGTGTGAGAGATAATAAAGCATTTATGACGATT	1380
1381	GCTGAACAGCACACACCATGCGTCCAGATAGAGAAAGCTTTCTCTCTTTATTTCGCATGCA	1440
1441	TGTTTTATTATCTTTTATCATATATATATAACACATATTAAATGATTCTTCGTTCCAATT	1500
-285		-226
1501	TATAATTCATTTGACTTTTTTATCCACCGATGCTCGTTTTATTAAAAAAAATATTATAAT	1560
-225		-166
1561	TATTGTTACTTTTTGTTGTAATATTGTTTAGCATATAATAAACTTTGATACTAGTATGTT	1620
-165		-106
49		
1621	TCCGAGCAAAAAAATATTAATATTTAGATTACGAGCCCATTAATTAATTATATTCGAG	1680
-105		-46
83 +1		
1681	ACAAGCGAAGCAAAGCAAAGCAAAGCTAATGTTGCCCTGCTGTGCATGCAGAGGCCCGCT	1740
-45		+15
73*****		
1741	CTTGCTATAAACGAGGCAGCTAGACGCGACTCGACTCATCAGCCTCATCAACCTCGACGA	1800
+16		+75

1801	AGGAGGAACGAACGGACAGGTTGTTGCACAGAAGCGACATGGCTTTTCGCGCCCAAAACGT	1860
+76		+135
M A F A P K T S		

U A 4 8 1 0 4 C 2

1861	CCTCCTCCTCCTCGCTGTCTCTCGGCGTTGCAGGCAGCTCAGTCGCCGCCGCTGCTCCTGA	1920
+126	S S S S L S S A L Q A A Q S P P L L L R	+195
1921	GGCGGATGTCGTCGACCGCAACACCGAGACGGAGGTACGACGCCGGCGGTGCTGCTCACTA	1980
+196	R M S S T A T P R R R Y D A A V V V T T	+255
1981	CCACCACCACTGCTAGAGCTGCGGCGGCTGCTGTACGGTTCGCCGCCGCCGCCGCCGAGG	2040
+256	T T T A R A A A A A V T V P A A P P Q A	+315
2041	CGGGCCGCCGCCGCCGGTGCACCAAAGCAAGCGGCGGCACCCGCAGAGGAGGAGCCGTC	2100
+316	G R R R R C H Q S K R R H P Q R R S R P	+375
2101	CGGTGTCGGACACCATGGCGGCGCTCATGGCCAAGGGCAAGGTTCTGTATAGTACGCGCGC	2160
+376	V S D T M A A L M A K G K	
2161	GTGTCGTCGTCGTTATTTTGCGCATAGGCGGGACATACACGTGCTTTAGCTAGCTAACA	2220
2221	GCTAGATCATCGGTGCAGACGGCGTTCATCCCGTACATCACCGCCGCGGACCCGGACCTA	2280
	T A F I P Y I T A G D P D L	
2281	GCGACGACGGCCGAGGCGCTGCGTCTGCTGGACGGCTGTGGCGCCGACGTCATCGAGCTG	2340
	A T T A E A L R L L D G C G A D V I E L	
2341	GGGGTACCCTGCTCGGACCCCTACATCGACGGGCCCATCATCCAGGCGTGGTGCGCGG	2400
	G V P C S D P Y I D G P I I Q A S V A R	
2401	GCTCTGGCCAGCGGCACCACCATGGACGCCGTGCTGGAGATGCTGAGGGAGGTGACGCCG	2460
	A L A S G T T M D A V L E M L R E V T P	
2461	GAGCTGTGTCGTCGCCCGTGGTGTCTCTCTACTACAAGCCCATCATGTCTCGCAGCTTG	2520
	E L S C P V V L L S Y Y K P I M S R S L	
2521	GCCGAGATGAAAGAGGCGGGGTCCACGGTAACTATAGCTAGCTCTTCCGATCCCCCTTC	2580
	A E M K E A G V H	
2581	AATTAATTAATTTATAGTAGTCCATTCATGTGATGATTTTGTCTTTTCTTTTACTGACA	2640
2641	GGTCTTATAGTGCTGATCTCCCGTACGTGCCCGCGCACTCGCTGTGGAGTGAAGCCAAG	2700
	G L I V P D L P Y V A A H S L W S E A K	
2701	AACAACAACCTGGAGCTGGTAGGTTGAATTAAGTTGATGCATGTGATGATTTATGTAGCT	2760
	N N N L E L	
2761	AGATCGAGCTAGCTATAATTAGGAGCATATCAGGTGCTGCTGACAACACCAGCCATACCA	2820
	V L L T T P A I P	
2821	GAAGACAGGATGAAGGAGATCACCAAGGCTTCAGAAGGCTTCGTCTACCTGGTAGTTATA	2880
	E D R M K E I T K A S E G F V Y L	
2881	TGTATATATAGATGGACGACGTAACCTCATTCCAGCCCCATGCATATATGGAGGCTTCAAT	2940
2941	TCTGCAGAGACGACGAAGACCACGACGACGACTAACACTAGCTAGGGGCGTACGTTGCAG	3000
3001	GTGAGCGTGAACGGAGTGACAGGTCTCTCGCGCAAACGTGAACCCACGAGTGGAGTCACTC	3060
	V S V N G V T G P R A N V N P R V E S L	

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

3061	ATCCAGGAGGTTAAGAAGGTGACTAACAAGCCCGTTGCTGTTGGCTTCGGCATATCCAAG	3120
	I Q E V K K V T N K P V A V G F G I S K	
3121	CCCGAGCACGTGAAGCAGGTACGTACGTAGCTGACCAAAAAAACTGTTAACAAGTTTTG	3180
	P E H V K	
3181	TTTGACAAGCCGGCTACTAGCTAGCTAACAGTGATCAGTGACACACACACACACAGAT	3240
	Q I	
3241	TGCGCAGTGGGGCGCTGACGGGGTGATCATCGGCAGCGCCATGGTGAGGCAGCTGGGCGA	3300
	A Q W G A D G V I I G S A M V R Q L G E	
3301	AGCGGCTTCTCCCAAGCAAGGCCTGAGGAGGCTGGAGGAGTATGCCAGGGGCATGAAGAA	3360
	A A S P K Q G L R R L E E Y A R G M K N	
	+++	
3361	CGCGCTGCCATGAGTCCATGACAAAGTAAAACGTACAGAGACACTTGATAATATCTATCT	3420
	A L P	
3421	ATCATCTCGGAGAAGACGACCGACCAATAAAAAATAAGCCAAGTGGAAGTGAAGCTTAGCT	3480
3481	GTATATACACCGTACGTCGTCGTCGTTCCGGATCGATCTCGGCCGGCTAGCTAGCAG	3540
3541	AACGTGTACGTAGTAGTATGTAATGCATGGAGTGTGGAGCTACTAGCTAGCTGGCCGTTT	3600
3601	ATTCGATTATAATTCTTCGCTCTGCTGTGGTAGCAGATGTACCTAGTCGATCTTGTACGA	3660
3661	CGAAGAAGCTGGCTAGCTAGCCGCTCTCGATCGTATATGTACTGATTAATCTGCAGATTGA	3720
	\$	
3721	ATAAAAACTACAGTACGCATATGATGCGTACGTACGTGTGTATAGTTTGTGCTCATATAT	3780
3781	GCTCCTCATCACCTGCCTGATCTGCCCATCGATCTCTCTCGTACTCCTTCTGTAAATG	3840
3841	CCTTCTTTGACAGACACACCACCACGACGAGTGACGCTCTGCACGCCGCCGCTTTAA	3900
3901	GACATGTAAGATATTTTAAGAGGTATAAGATACCAAGGAGCACAAATCTGGAGCACTGGG	3960
3961	ATATTGCAAAGACAAAAAACAATAAAGTCCCACCAAAGTAGAGATAGTAAAGA	4020
4021	GGTGGATGGATTAAAATTATCTCATGATTTTGGATCTGCTCAAATAGATCGATATGGTA	4080
4081	TTGAGATCTATGTTGTATAGCCTTTTCATAGCTTTCTGAAAAAATGGTATGATGAG	4140
4141	TGCGGAGTAGCTAGGGCTGTGAAGGAGTCGGATGGGCTTCCACGTACTTGTGTGGCCC	4200
4201	TAGTCCGGTTCTATTTAGGTCCGATCCGAGTCCGGCATGGTCCGGTTCCATACGGGCTAG	4260
4261	GACCAAGCTCGGCACGTGAGTTTTAGGCCCGTCGGCTAGCCCGAGCAGACCCGTTTTTA	4320
4321	AACCTGGCTAGGACTCGCCCATTTAATAAGACAAACATTGCAAAAAATAGCTCTATTTTTT	4380
4381	ATTTAAATATATTGTTTATTTGTGAAATGTGATTATTTGTAATATATATTATTGTATA	4440
4441	TAGTTATATCTTCAATTATGATTTATAAATATGTTTTTTATTATGAACSAATTTAAGT	4500
4501	TTGATTTATGCGTTGGCGGGCTCGAGGAGGCACGGTGAACATTTTGGGTCCGGCTTAAC	4560
4561	GGGTCCGCCCGGCCCGGTTCCGGCCCATCCACGGCCCATCCCGTGTGGGCTCGTTCGGTG	4620
4621	AGTTCAGCCCGTCCGACAAACCGTCCCCGGCCCGGATAATTAATCGGGCTTAACCGTGGC	4680
4681	GTGCTTAAACGGTCCGTGCCTCAACGGACCGGGCCGGCGGGCGGCCGTTTGACATCTCTA	4740
4741	GTGGTGTGATTAGAGATGGCGATGGGAACCGATCACTGATTCGCTGTGGAGAATTGATA	4800
4801	TCAAGCTTATCGATACC	481

Полная последовательность кукурузного гена TrpA, с интронами и экзонами, начала транскрипции и трансляции, начало и окончания ДНК.

\$ = начало и конец кДНК; +I = начало транскрипции; 73^{XXXXXXX} = праймер расширения праймера; ↓ = начало трансляции; +++ = терминирующий кодон; _____ = CCAAT бокс, TATAA бокс, поли А дополнительный сайт.

Подчеркнутые последовательности ^(с проставленным) являются праймерами PCR

Фиг. 25 А

211D						5N984						
60d						70d						
P	C	BR	ES	LP	MP	UP	C	BR	ES	LP	MP	UP

211D						5N984					
						39d			46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP		



нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена TgrA в ткани кукурузы. Двухчасовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов Диронт Стоке

Фиг.25 В

211D						5N984					
60d						70d ₇					
P	C	BR	ES	LP	MP UP	C	BR	ES	LP	MP UP	



211D					5N984				
					39d		46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP



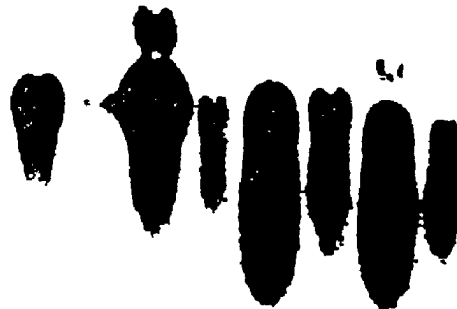
Рис.25В - нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена Т рА в ткани кукурузы. Четырехчасовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы

Фиг. 25 С

211D						5N984						
						60d			70d ⁷			
P	C	BR	ES	LP	MP	UP	C	BR	ES	LP	MP	UP



211D					5N984					
					39d			46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP	



нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена TgrA в ткани кукурузы. 18-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы

Фиг. 25 Д

211D						5N984					
60d						70d					
P	C	BR	ES	LP	MP UP	C	BR	ES	LP	MP	UP



211D						5N984					
						39d			46d		
S	L	R	P	SH	LP UP	LP UP	LP	MP	UP		



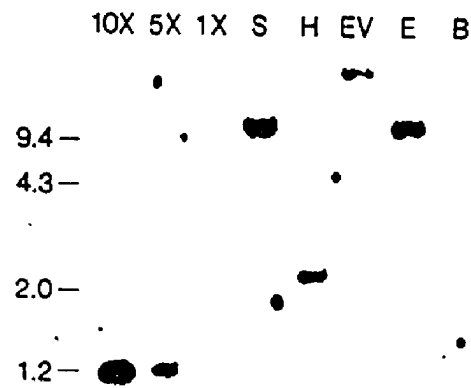
нозерн-блот, показывающий различную экспрессию гена TgrA в ткани кукурузы. 48-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы

211D		5N984		211D				
L	P	L	P	S1	S2	S3	S4	S5



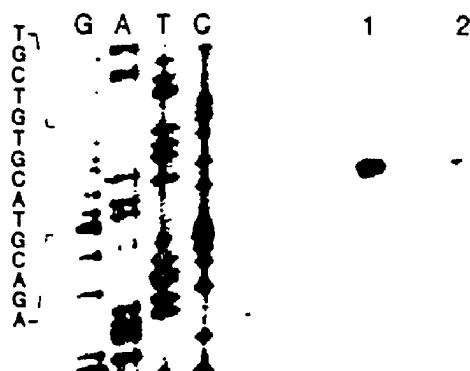
нозерн-блот, показывающий экспрессию кукурузного гена TrpA в лист и сердцевину линии Фанка 211D и 5N984 и отсутствие экспрессии в общую РНК семени линии 211D. 65-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Диронт Стокех.

Фиг. 27



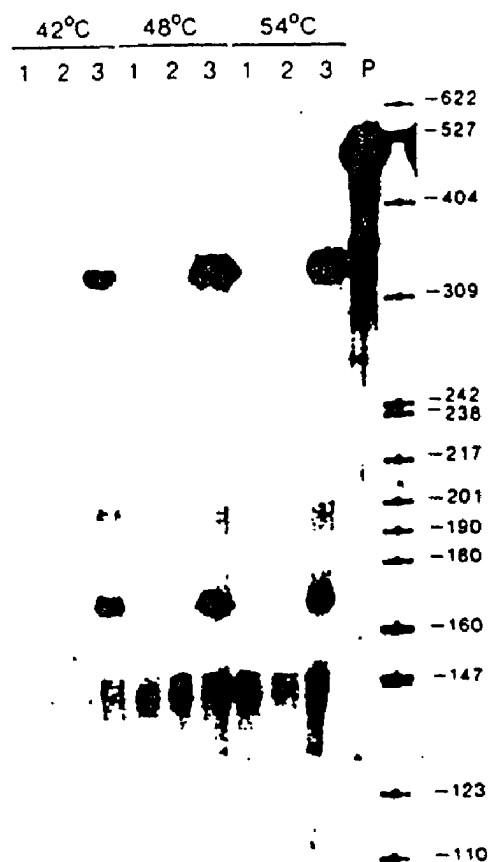
геномный саузерн линии Фанка 211Д, зондированной
ТгРА кДНК 8-2.
120-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с исполь-
зованием усиливающих экранов фирмы Дирон t Сгопех.

Фиг. 28 А



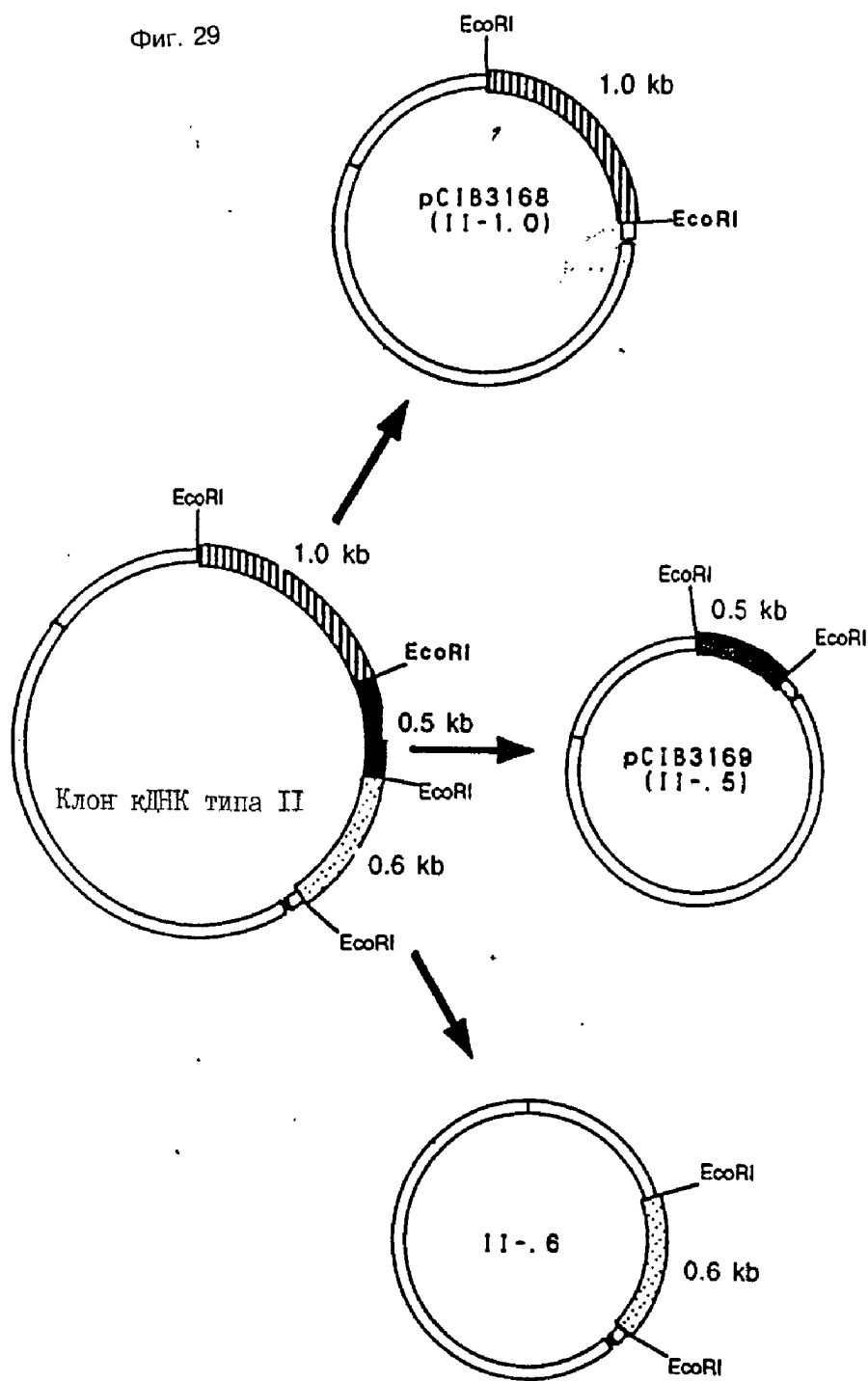
расширение праймера, показывающее начало транскрипции гена TrpA и секвенирующий лэддер. 1-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с использованием усиливающих экранов фирмы Директ Cronex.

Фиг. 28 В



от
защита РНКазы на участке от + 2 bp до + 387 bp при
трех температурах гибридизации.
16-часовая экспозиция на пленку при температуре -80°C с исполь-
зованием усиливающих экранов фирмы Диронт Стронх.

Фиг. 29



UA 48104 C2

UA 48104 C2

Последовательность κДНК СДРК пыльцы кукурузы

последовательность, содержащаяся в клонах pCIB3I68 и
pCIB3I69

1 TG CAG ATC ATG CAC CAC CTC TCC GGC CAG CCC AAC GTG GTG GGC CTC CGC GGC GCG
1↓ Gln Ile Met His His Leu Ser Gly Gln Pro Asn Val Val Gly Leu Arg Gly Ala

57 TAC GAG GAC AAG CAG AGC GTG CAC CTC GTC ATG GAG CTG TGC GCG GGC GGG GAG TTC
19↓ Tyr Glu Asp Lys Gln Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly Gly Glu Leu

Aval

114 TTC GAC CGC ATC ATC GCC CGG GGC CAG TAC ACG GAG CGC GGC GCC GCG GAG CTG CTG
39↓ Phe Asp Arg Ile Ile Ala Arg Gly Gln Tyr Thr Glu Arg Gly Ala Ala Glu Leu Leu

171 CGC GCC ATC GTG CAG ATC GTG CAC ACC TGC CAC TCC ATG GGG GTG ATG CAC CGG GAC
57↓ Arg Ala Ile Val Gln Ile Val His Thr Cys His Ser Met Gly Val Met His Arg Asp

Aval

228 ATC AAG CCC GAG AAC TTC CTG CTG CTC AGC AAG GAC GAG GAC GCG CCG CTC AAG GCC
72↓ Ile Lys Pro Glu Asn Phe Leu Leu Leu Ser Lys Asp Glu Asp Ala Pro Leu Lys Ala

285 ACC GAC TTC GGC CTC TCC GTC TTC TTC AAG GAG GGC GAG CTG CTC AGG GAC ATC GTC
95↓ Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Phe Lys Glu Gly Glu Leu Leu Arg Asp Ile Val

Aval

342 GGC AGC GCC TAC TAC ATC GCG CCC GAG GTG CTC AAG AGG AAG TAC GGC CCG GAG GCC
114↓ Gly Ser Ala Tyr Tyr Ile Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Lys Tyr Gly Pro Glu Ala

399 GAC ATC TGG AGC GTC GGC GTC ATG CTC TAC ATC TTC CTC GCG GCG GTG CCT CCC TTC
133↓ Asp Ile Trp Ser Val Gly Val Met Leu Tyr Ile Phe Leu Ala Gly Val Pro Pro Phe

456 TGG GCA GAG AAC GAG AAC GGC ATC TTC ACC GCC ATC CTG CGA GGG CAG CTT GAC CTC
152↓ Trp Ala Glu Asn Glu Asn Gly Ile Phe Thr Ala Ile Leu Arg Gly Gln Leu Asp Leu

513 TCC AGC GAG CCA TGG CCA CAC ATC TCG CCG GGA GCC AAG GAT CTC GTC AAG AAG ATG
171↓ Ser Ser Glu Pro Trp Pro His Ile Ser Pro Gly Ala Lys Asp Leu Val Lys Lys Met

570 CTC AAC ATC AAC CCC AAG GAG CCG CTC ACG GCG TTC CAG GTC CTC AAT CAC CCA TGG
190↓ Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Arg Leu Thr Ala Phe Gln Val Leu Asn His Pro Trp

627 ATC AAA GAA GAC GGA GAC GCG CCT GAC ACG CCG CTT GAC AAC GTT GTT CTC GAC AGG
209↓ Ile Lys Glu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Thr Pro Leu Asp Asn Val Val Leu Asp Arg

684 CTC AAG CAG TTC AGG GCC ATG AAC CAG TTC AAG AAA GCA GCA TTG AGG ATC ATA GCT
228↓ Leu Lys Gln Phe Arg Ala Met Asn Gln Phe Lys Lys Ala Ala Leu Arg Ile Ile Ala

741 GCG TGC CTA TCC GAA GAG GAG ATC ACA GCG CTG AAG GAG ATG TTC AAG AAC ATT GAC
247↓ Gly Cys Leu Ser Glu Glu Glu Ile Thr Gly Leu Lys Glu Met Phe Lys Asn Ile Asp

798 AAG GAT AAC AGC GGG ACC ATT ACC CTC GAC GAG CTC AAA CAC GGG TTG GCA AAG CAC
266↓ Lys Asp Asn Ser Gly Thr Ile Thr Leu Asp Glu Leu Lys His Gly Leu Ala Lys His

855 GGG CCC AAG CTG TCA GAC AGC GAA ATG GAG AAA CTA ATG GAA GCA GCT GAC GCT GAC
285↓ Gly Pro Lys Leu Ser Asp Ser Glu Met Glu Lys Leu Met Glu Ala Ala Asp Ala Asp

EcoRI

912 GGC AAC GGG TTA ATT GAC TAC GAC GAA TTC GTC ACC GCA ACA GTG CAT ATG AAC AAA
304↓ Gly Asn Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Glu Phe Val Thr Ala Thr Val His Met Asn Lys

Фиг. 30 (продолжение)

969 CTG GAT AGA GAA GAG CAC CTT TAC ACA GCA TTC CAG TAT TTL GAC AAG GAC AAC AGC
 323 Leu Asp Arg Glu Glu His Leu Tyr Thr Ala Phe Gln Tyr Phe Asp Lys Asp Asn Ser
 1026 GGG TAC ATT ACT AAA GAA GAG CTT GAG CAC GCC TTG AAG GAG CAA GGG TTG TAT GAC
 342 Gly Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Leu Glu His Ala Leu Lys Glu Gln Gly Leu Tyr Asp
 1083 GCC GAT AAA ATC AAA GAC ATC ATC TCC GAT GCC GAC TCT GAC AAT GAT GGA AGG ATA
 361 Ala Asp Lys Ile Lys Asp Ile Ile Ser Asp Ala Asp Ser Asp Asn Asp Gly Arg Ile
 1140 GAT TAT TCA GAG TTT GTG GCG ATG ATG AGG AAA GGG ACG GCT GGT GCC GAG CCA ATG
 380 Asp Tyr Ser Glu Phe Val Ala Met Met Arg Lys Gly Thr Ala Gly Ala Glu Pro Met
 1197 AAC ATC AAG AAG AGG CGA GAC ATA GTC CTA TAG TGAAGTGAAGCAGCAAGTGTTAATGTAATGTG
 399 Asn Ile Lys Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu ...
 1262 TATAGCACTCTCAAAACAAGCAAAATTGTACATCTGTACACAAATGCAATGGGGTTACTTTTGCACAAAAA
 1340 AAAAAAAAAA

Фиг. 31

Внутреннее листовое влагалище

Внутренняя листовая мутовка

Зеленый лист

Пыльник

Пыльца

Шелк

Зерно

Сердцевина

Корень



UVA 48104 C2

UA 48104 C2

Seq1 Seq2

```

001 CDPK ptn YSMGKELGRGDFGVTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREDVODVVRREVOIHMHLSGQPNVYGLRGAYE 16
Y : ELG:G.F:V: C: :TS: A K I : KL:AR: : : RE: I : L : PN:V : : :
rot pk2 ptn YOLFELGKGAFSVVRRVCVKKTSTCEYAAKIINTKKLSARDH-OKLEREARICRLK-HPNIVRLHOSIS 81

001 CDPK ptn DKQSVHLYNELCAGGELFDRIIARGOYTERGAAELLRAIVQIYHTCHSMGYMHRDIXPENFLLLSKDEDA 23
: : : LV: : L : GGELF: I:AR: Y:E: A: : : : : V: : H : : : HRD: KPN: LL SK : : A
rot pk2 ptn EEGFHYLVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHCIHQILESYNHIIHQHDIYHRDLKPNELLASKCKGA 15

001 CDPK ptn PLKATDFGLSYFFKEGELLR-DIVGSAYYIAPEVLKRK-YGPEADTWSYGVHLYIFLAGYPPFWAENENG 30
: : K : DFGI: : : : : : : G: Y: PEVL: : YG : DIW: GV: LYI: L: G PPFW: E: :
rot pk2 ptn AVKLADFGLAIEVOGEQDAWFGFAGTFCYLSPEVLRKDPYGKPYDIWACGVILYILLVGYPPFWDEDGKH 22

001 CDPK ptn IFTAILRGOLDLSSEPWPHISPGAKDLYKKMLN:NPKERLTAFOVLNHPWIKEDGDADPTPLDNVYLDRL 37
: : : I G: D: S W : : P:AK: L: : ML : NP R: TA Q: L: HPW: : : : : : : L
rot pk2 ptn LYQIKAGAYDFPSPEWDTVPEAKNLINOMLT:NPAKRITADGALKHPWVCCRSTVASHMHRGETVECL 29

001 CDPK ptn <CFRANHCFKAALRII 387
: : F: A: : : K A L : :
rot pk2 ptn <CFNARRK<GA: : : 308

```

Lioman-Pearson Protein Alignment

Seq1 Seq2

```

pol CDPK ptn LSEEEITGLKEMFKNIKONSGTITLDELKHGLAKHGPKLSDSEMEKLMHAADAGNGLIDYDEFYATY 460
L:EE:I:;KE F.;DKD.GTIT.EL.:G.:.E:..DADGNG ID:EF:T.
humcoma ptn LTEEQIAEFKEAFSLFDKOGOGTITTKELGTVMRSLGONPTEAELDMINEVDAOGNGTIDFPEFLTHMA 74

pol CDPK ptn H-MNKLDRREHLTYAFQYFDKONSGYITKEELEHALKEOG-LYDADKIKDIISDADSDNDGRIDYSEFYA 528
:M.:O.EE:..AF:FDKD.:GYI:..EL H.:.G.:.I:..AD D.DG:..Y.EFY.
humcoma ptn RNMKDTDSEEEI REAFRVFOXGNGYI SAAELRHVHTNLGEKLTDEEVDEMI READIDGOGOVNYEEFYQ 144

pol CDPK ptn MM 530
MM
humcoma ptn MM 146

```

Фиг. 34

Lipman-Pearson Protein Alignment

Gap Penalty: 2, Gap Length Penalty: 12

Seq1	Seq2	Similarity	Gap	Gap	Consensus
pol CDPK ptn	soybean CDPK ptn	Index	Number	Length	Length
1>551	1>509	62.4	1	1	464

```

pol CDPK ptn      VLGPRMEDVRATYSHGKELGRGQFGVTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREDDVDDYRREYGIHHHLSG 50
soybean CDPK ptn  VLPQRTQNTIREVVEYGRKLGOGGFGTTFFECTRRASGGKFACKSIPKRKLLCKEDYEDVWREIGIMHHLSE 9

pol CDPK ptn      QPNVYGLRGAYEDKQSYHLMELCAGGELFDRIIARGOYTERGAELLRRAIVQIVHTCHSMGYMHRDIKP 220
soybean CDPK ptn  HANYVRIEGTYEDSTAVHLMELCEGGELFDRIYQKGHYSERQAARLIKTIYEVVEACHSLGYMHRDLKP 61

pol CDPK ptn      ENFLLLSKDEDAPLKATDFGLSVFFKEGELLRDIVGSAYYIAPEVLKRKYGPEADIVSYGVHLYIFLAGY 290
soybean CDPK ptn  ENFLFOTIDEDAKLKATDFGLSVFYKPGESFCOVVGSPPYYVAPEVLRKLYGPESDVVSAGVILYILLSGV 23

pol CDPK ptn      PPFWAENENGIFTAILRGOLDLSSEPWPHPISPGAKDLVKKMLNINPKERLTAFOVLNHPWKEDGADPDT 360
soybean CDPK ptn  PPFWAESEPGIFRQILLGKLDHFSEPWPISDSAKDLIRKMLDONPKTRLTAHEVLRHPWIVDNIAPDK 301

pol CDPK ptn      PLDNYVLDRLKQFRAMNOFKKAALRIIAGCLSEEEITGLKEMFNIDKNSGTITLDELKHGLAKHGPKL 430
soybean CDPK ptn  PLDSAVLSRLKQFSAMNKLKMLRVIAERLSEEEIGGLKELFKMIDKNSGTITFDELKGLKRVGSEL 377

pol CDPK ptn      SDSEMEKLMEADAAGNGLIDYDEFYTATVHMNKLDRREHLYTAFQYFDKDNNGYITKEELEHALKEOGL 500
soybean CDPK ptn  MESEIKDLMDAADIDKSGTIDYGEFIAATVHNLKLEREENLYSAFSYFDKDCSGYITLDEIQCAKDFGL 441

pol CDPK ptn      YDADKIKDIISDADSDNDRIDYSEFVAMHRKGTAGAEPNNIKK 544
soybean CDPK ptn  -DDI-IDDNKEIDCDNDGGIDYGEFAAMHRKGNNGTGRRTMRK 484
  
```

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

Ферменты:

6 из 198 ферментов /отфильтрованных/

Свойства:

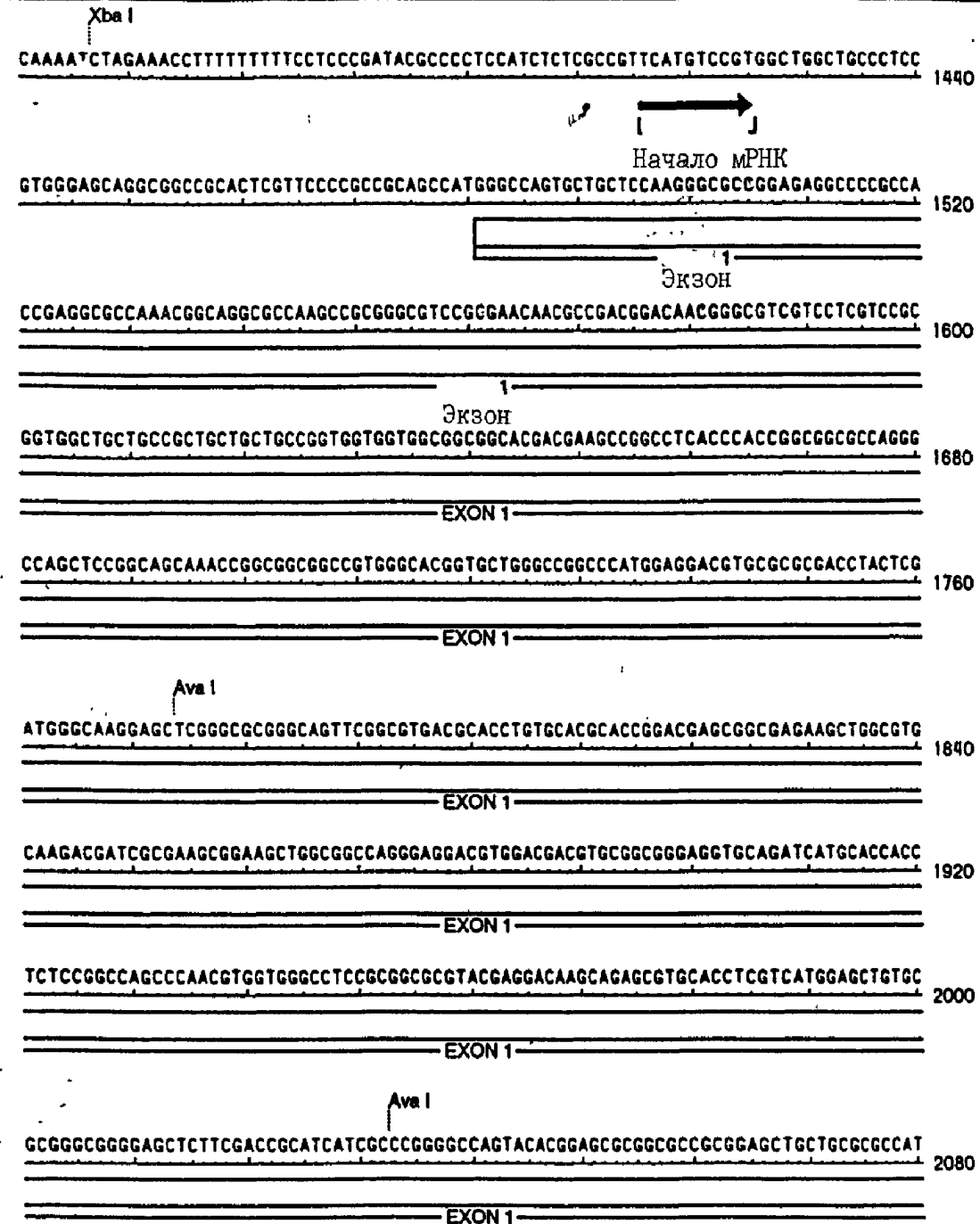
количество, только определенные сайты, стан-

TTAGTAAACACCTCTCCAATCGCTTGGGTGGCACAATTCCTAGCTTTATCACAATTTAAGAAATAGAGTTCACCACTTC 80
 AAAATATGCCTATACAATGAATGATGCTTGGATGCAATATAGCTAGATTCAACTAGCTATATATGGTCAATAGAACCCTG 160
 TGAGCACCTCACAACACGACTTCAATTTGAGACCCTAAGCGAGTAAATGGTTAAAGTCTCTTATTATTAGTCTTAGG 240
 ACTTCTCCTTGCTAAATGCTTGTCAAGCATCTATATATCTTCCCACTGCGGGAGATACTATATATAGGGCCTTGGACCT 320
 CTAGGGTATCTCAAAGGCCTAGTCACAACAATTCCTCAACAGTATTTAATTTATACATGTATGAACAGGTAGGAATTTG 400
 AGTGCCCAACCCAAGAGTGGGAGGTGTAATTTGGGTAGCTAACTTAAATAGGGCTCTTCTTATTAGGTTTATCTAGTC 480
 TCTACTTAGACTAATTCAGAAAGAATTTACAACCTATGCTTAATCATATCTCTAGTCTAAGCAAATTTAGGAAAGTTAA 560
 AAGCACACAATTAGGCACATGTGAAAGATGTGTATGGTAAGTAAAGACTTATAAGGAAAAAGTGGGTGAATCCTCAAGA 640
 TGTGGTGGTATATCCCAATGATATTAGATGCCAGAATATAGGGGGGAAATCGATGTATACCATCTCTACCAGGATACCTG 720
 TGCGGACTGTGCAACTGACACATGGACCATGGTGTCTTCTTAGATTTGGTTATTAGCTAATTGCGCTACAACCTGTTCAA 800
 GGCTAGACCAAATTAATAAATAATATTAACATAAAAGTTAGGCAAACTATAGTAAATTATGCAGCGATCCAACAACA 880
 AGCCATGTCTCGTGGGTCATGAGCCACGCGTCGGCCATACCCACATGATGTTTCCATACGGATGGTCTTATGCAATT 960
 TTGTCTGCAAAACACAAGCCTTAATACAGCCACGCGACAATCATGGAAGTGGTCGTTTTAGGTCCTCATCATGAAGTTCA 1040
 GGGAAAACGCATCAAATGTAATGCAGAGAAATGGTATTTCTTCTCTTGTAATCAGGGAGAGGAGTACCATCAGTACAGA 1120
 TTCAGAAATCAGAATTCAGTCTTCCAACGACAATAATCGAGCATCTTGTAATAATTGCAGAACTTCTGTTTGACTTGT 1200
 AGCCCTGACCTTTGCAAAATTTGAAGTTGTGCTGCTGACACAACCTCAATCTGGAAGTGTGTTGATCAGTTTGGCA 1280
 GAAACAGCAAGCAGCCTATATATCTGTCAAGAGACACCTGCCGCCCTCTTCTTCCCGCCATTCCCTCCCTACCCCTT 1360

EcoRI

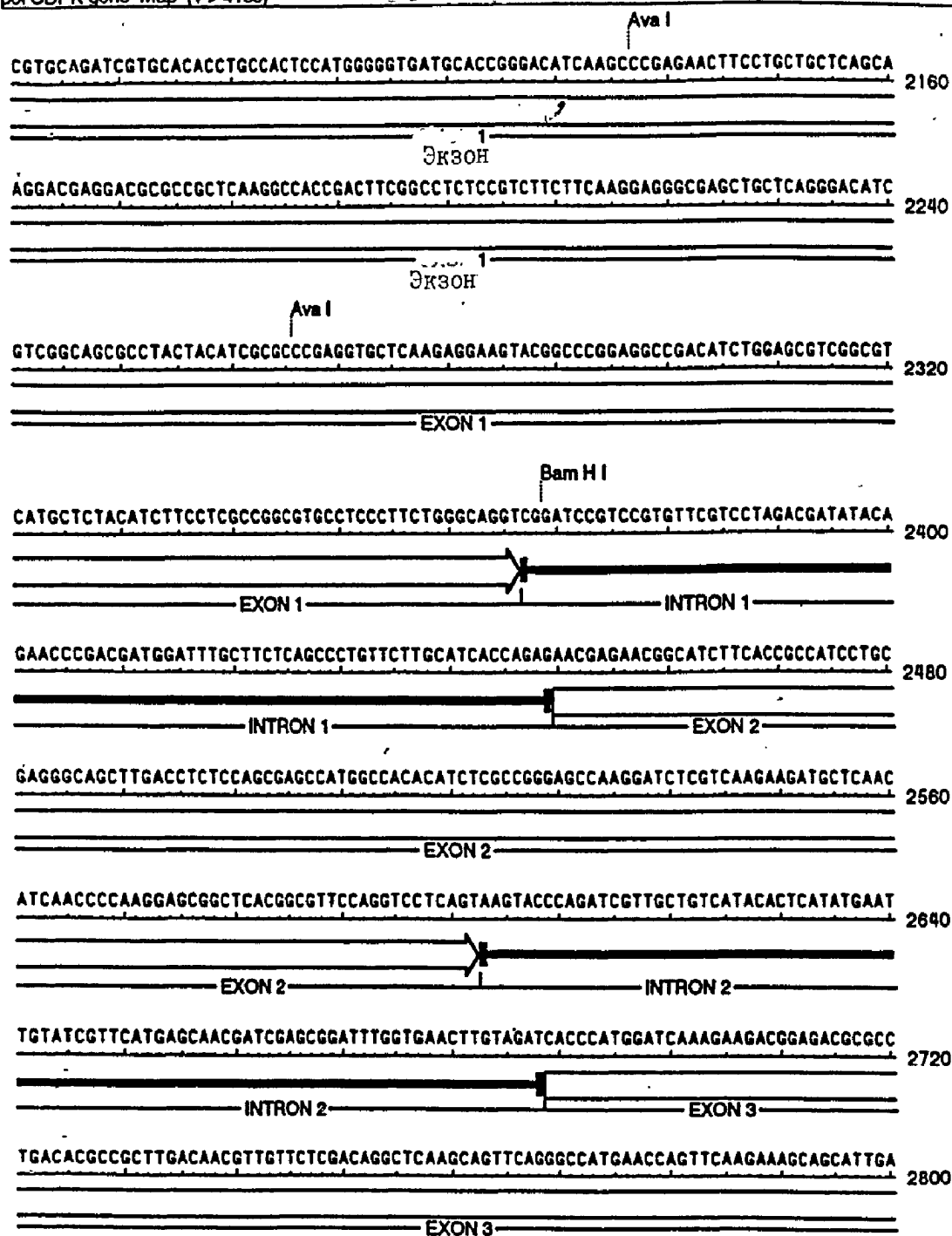
Фиг. 35 (продолжение)
Сайт и последовательность

pol CDPK gene Map (1 > 4165)



Фиг. 35 (продолжение)
Сайт и последовательность

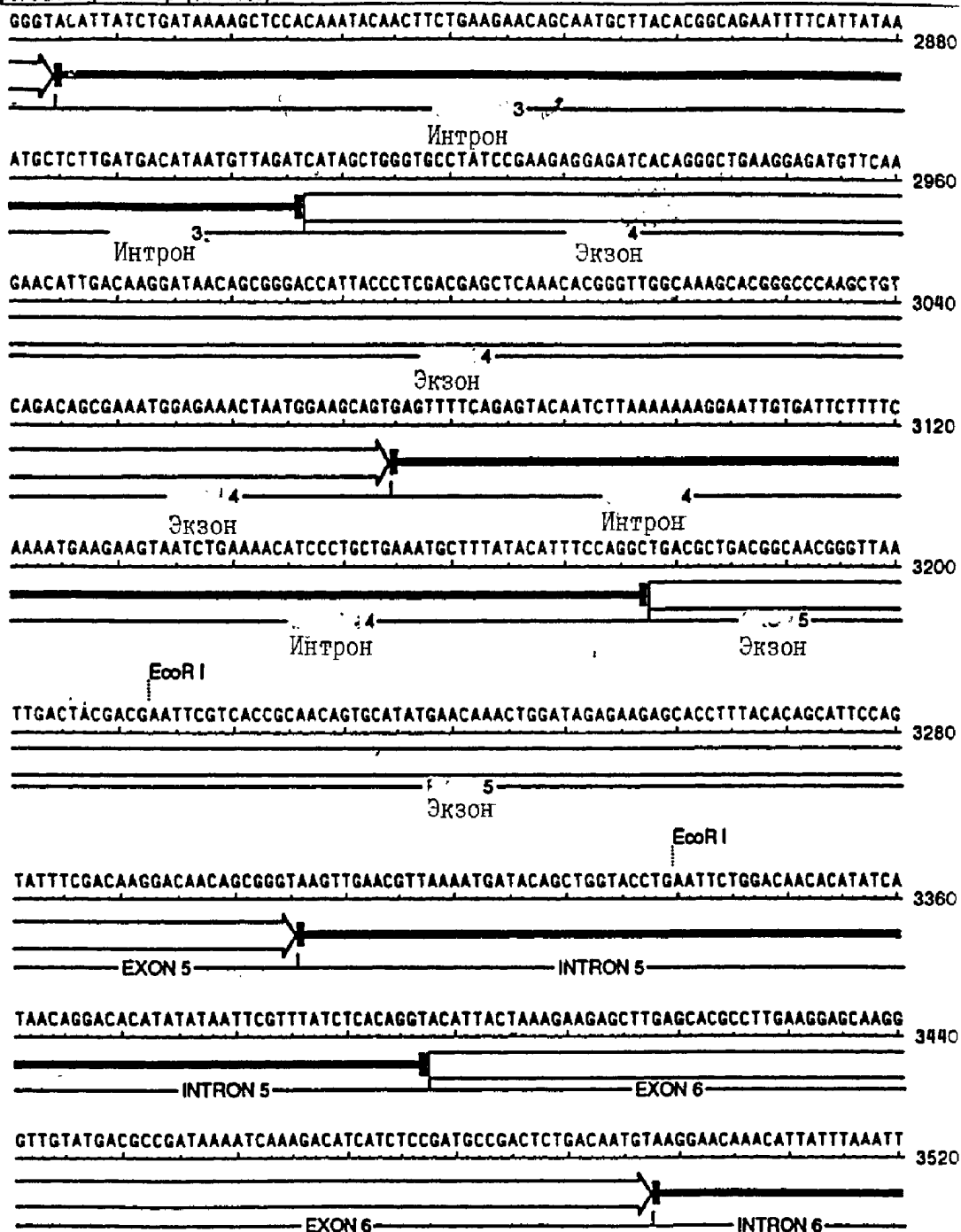
pol CDPK gene Map (1 > 4165)



Фиг. 35 (продолжение)

Сайт и последовательность

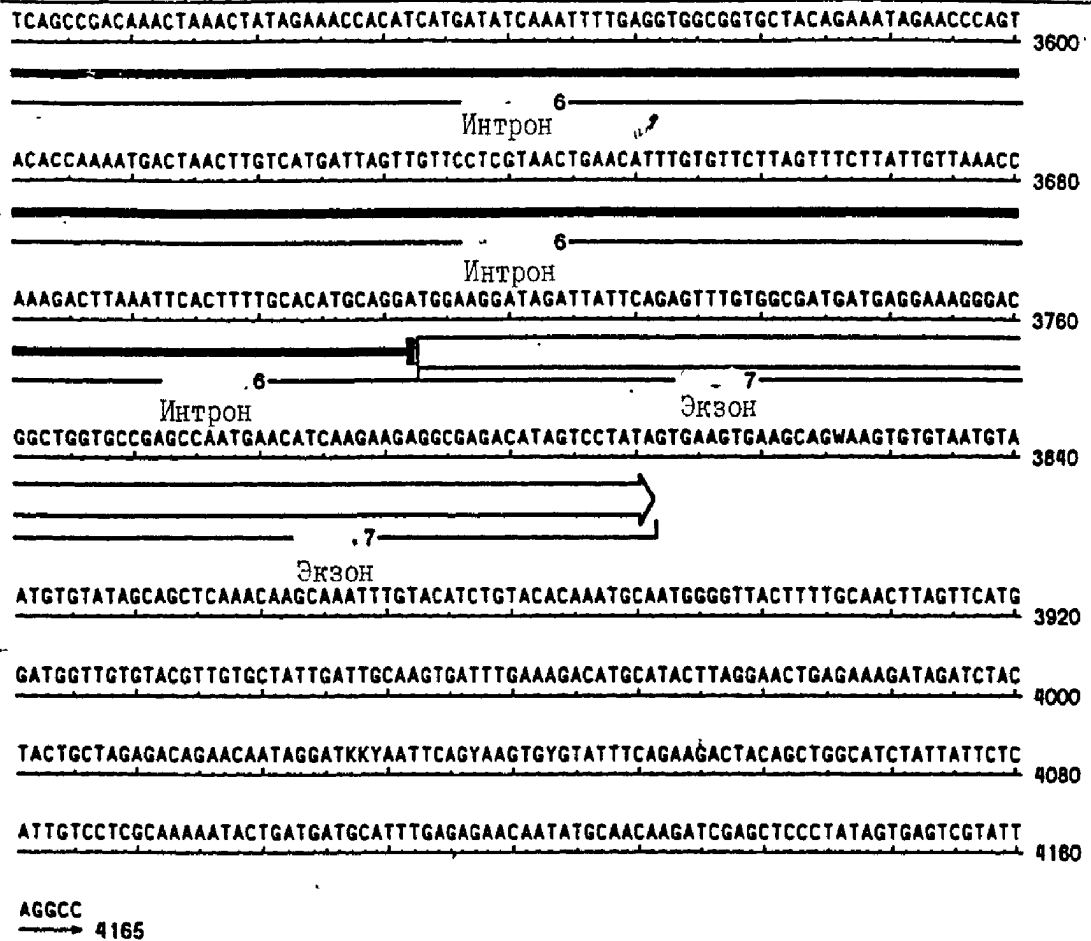
pol CDPK gene Map (1 > 4165)



Фиг. 35 (продолжение)

Сайт и последовательность

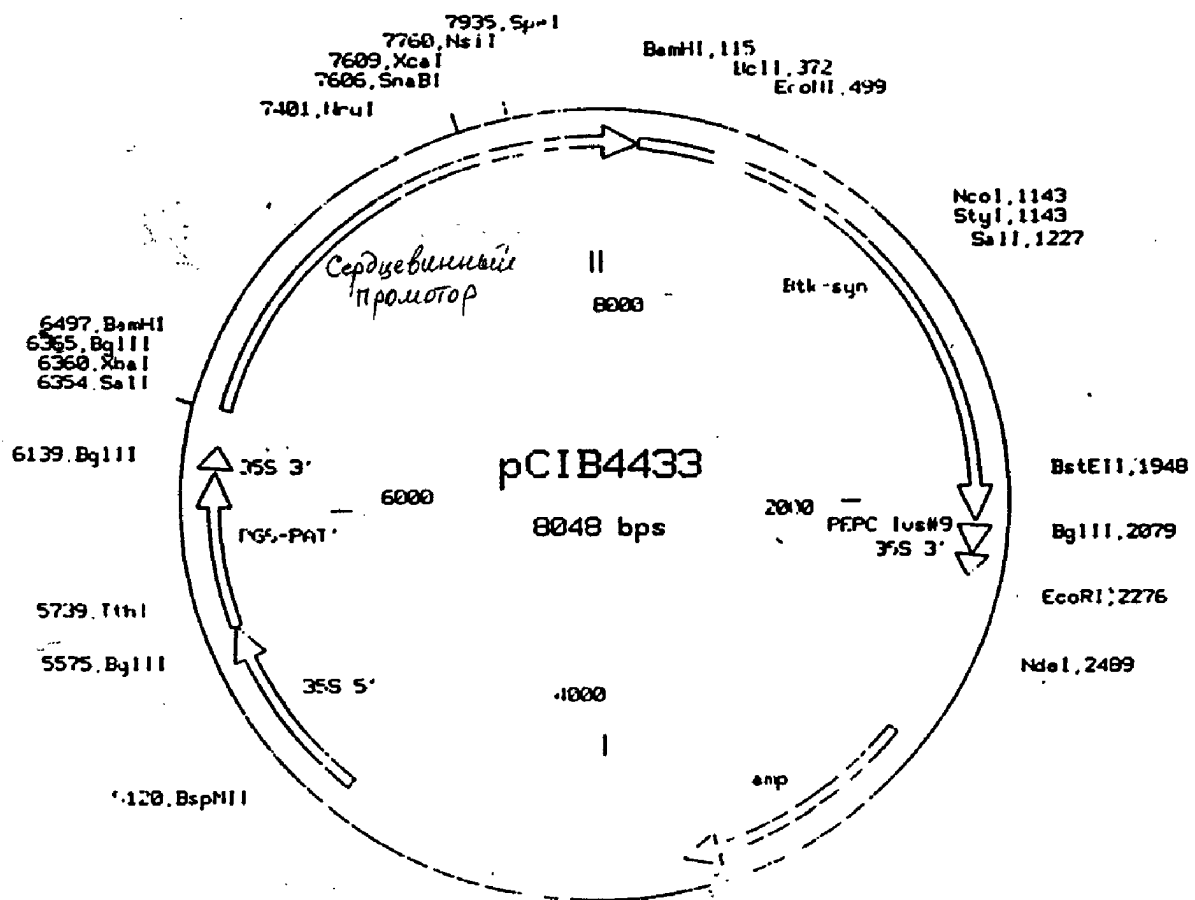
pol CDPK gene Map (1 > 4165)



U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2

U A 4 8 1 0 4 C 2



U A 4 8 1 0 4 C 2

Фиг. 37
 Наименование: 7415 BPS ДНК кольцевая на дату 9/21/92
 Описание: pGFI с синтетическим термостабильным элементом Geiser

Последовательность

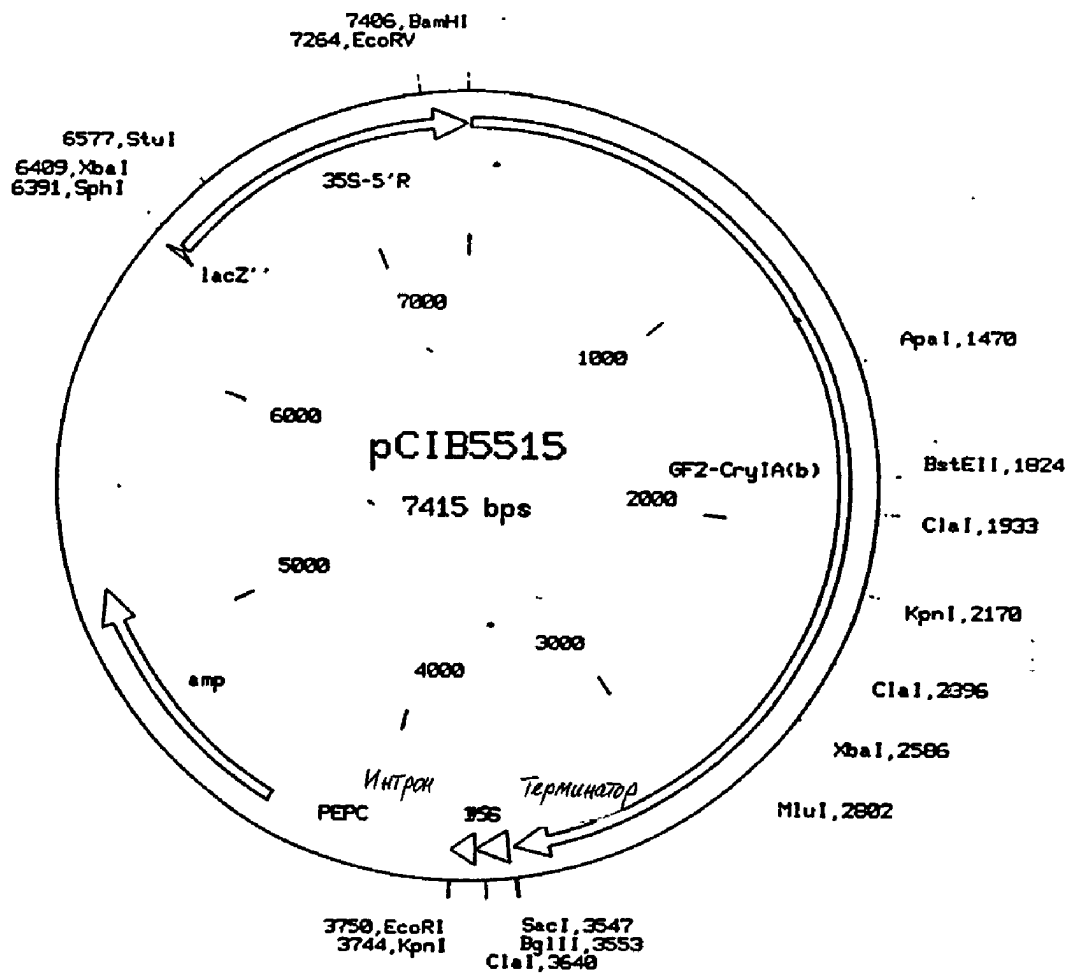
1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGCCTTCGT GCTGGGCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACGAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCGGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCC GCGAGCTGAC CCGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCGTCGG CTCAGCGGC CCCGAGITCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCTGTGA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGAG TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCGG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TCGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TCGCCCCATC ATTCCCATCA TTTCTCCTTG GACATTGATG TTGGATGTAC AGACTTAAAT
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACTTAG GTGTATGGGT GATATTCAAG ATTAAGACGC AAGATGGCCA TGCAAGACTA
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGAAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

U A 4 8 1 0 4 C 2

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACCGGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTC AATCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu
 3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTQACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGGAAGG AACATTCATC GTGGACAGCG TGGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---

C 2
 4 8 1 0 4
 U A



Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.