



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **46 689** ⁽¹³⁾ **C2**

(51)МПК ⁷ **C 12N 15/29 A, C 12N 15/62 B,
C 12N 15/82 B, C 12N 5/04 B, C
12N 5/10 B, A 01H 5/00 B, C 12P
21/02 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 93003022, 18.06.1993

(24) Дата начала действия патента: 17.06.2002

(30) Приоритет: 15.04.1992 СА 2, 118, 113

(46) Дата публикации: 15.06.2002

(72) Изобретатель:

Молони Маурис М., СА

(73) Патентовладелец:

СЕМБАЙОЗИС ДЖЕНЕТИКС ИНК., СА

(54) СПОСОБ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА РАСТИТЕЛЬНОЙ ИЛИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ-ХАЗЯЙНОМ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО СЛИТОГО ПОЛИПЕПТИДА, СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПИЩИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕМЯН, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА, СВЯЗАННОГО С МАСЛЯНЫМ ТЕЛОМ, СПОСОБ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, СВЯЗАННОГО С МАСЛЯНЫМ ТЕЛОМ, ХИМЕРНАЯ ДНК, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ КАССЕТА, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННОГО РАСТЕНИЯ, КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к классу генов, называемому генами протеинов масляных тел, в частности, олеозинов, на характерных свойствах которых основан заявленный способ получения рекомбинантных протеинов, при котором представляющий интерес протеин можно легко отделить от других компонентов клетки-хозяина. Способ состоит в том, что рекомбинантный полипептид экспрессируется в форме рекомбинантного слитого полипептида, содержащего протеин масляного тела и представляющий интерес протеин. Далее, способ включает распределение слитого полипептида в липидную фазу, содержащую масляные тела. Масляные тела, далее, легко отделить от остального клеточного материала. Представляющий интерес полипептид выделяют,

обрабатывая слитый протеин протеазой, способной распознавать протеолитический сайт распознавания протеина масляного тела, ближайший к N-концу полипептида, представляющего интерес. Предложены также химерная ДНК, экспрессирующая кассета и культура растительных клеток для осуществления указанного способа, а также способ изготовления пищи на основе модифицированных семян растений.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **46 689** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 15/29 A, C 12N 15/62
B, C 12N 15/82 B, C 12N 5/04 B,
C 12N 5/10 B, A 01H 5/00 B, C
12P 21/02 B**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

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

(21), (22) Application: 93003022, 18.06.1993

(24) Effective date for property rights: 17.06.2002

(30) Priority: 15.04.1992 CA 2, 118, 113

(46) Publication date: 15.06.2002

(72) Inventor:

Molony Mauris M., CA

(73) Proprietor:

SYMBIOSIS GENETIX INC., CA

(54) METHOD OF EXPRESSION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE BY VEGETABLE OR BACTERIAL HOST CELL, METHOD FOR PRODUCING AND ISOLATION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE FROM RECOMBINANT MERGED POLYPEPTIDE, METHOD FOR PREPARATION OF MODIFIED SEED-BASED FOOD, METHOD FOR PRODUCING OF FERMENT LINKED WITH OIL BODY, METHOD OF EXPRESSION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE LINKED WITH OIL BODY, CHIMERICAL DNA, EXPRESSIVE CASSETTE, METHOD FOR PRODUCING OF TRANSGENE PLANT, CULTURE OF PLANT CELLS

(57) Abstract:

The invention relates to gene class called protein genes of oil bodies, in particular, oleosins, on characteristic properties of which the proposed method for producing of recombinant proteins is based, in which method the protein of interest may be easily separated from other components of host cell. The method consists in that recombinant polypeptide is expressed in the form of recombinant merged polypeptide containing protein of oil body and protein of interest. Then, the method includes distribution of merged polypeptide in lipidic phase containing oil bodies. Further, oil bodies are easily separated from the rest of cell material. Polypeptide of

interest is isolated by treatment of merged protein by protease able to recognize proteolytic site of recognition of protein of oil body next to N-end of polypeptide of interest. Are also proposed chimerical DNA, expressive cassette and culture of plant cells for realization of said method, and also method of preparation of modified seed-based food.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 6, 15.06.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **46 689** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/29 A, C 12N 15/62 B,
C 12N 15/82 B, C 12N 5/04 B, C
12N 5/10 B, A 01H 5/00 B, C 12P
21/02 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
93003022, 18.06.1993

(24) Дата набуття чинності: 17.06.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 15.04.1992 CA 2, 118, 113

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.06.2002

(72) Винахідник(и):

Молоні Мауріс М. , СА

(73) Власник(и):

СЕМБАЙОЗІС ДЖЕНЕТИКС ІНК., СА

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ПОЛІПЕПТИДУ РОСЛИННОЮ АБО БАКТЕРІАЛЬНОЮ КЛІТИНОЮ-ХАЗЯЇНОМ, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ТА ВИВІЛЬНЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ПОЛІПЕПТИДУ З РЕКОМБІНАНТНОГО ЗЛИТОГО ПОЛІПЕПТИДУ, СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ЇЖИ НА ОСНОВІ МОДИФІКОВАНОГО НАСІННЯ, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТУ, ЗВ'ЯЗАНОГО З МАСЛЯНИМ ТІЛОМ, СПОСІБ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ПОЛІПЕПТИДУ, ЗВ'ЯЗАНОГО З МАСЛЯНИМ ТІЛОМ, ХИМЕРНА ДНК, ЕКСПРЕСУЮЧА КАСЕТА, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННОЇ РОСЛИНИ, КУЛЬТУРА РОСЛИННИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Винахід відноситься до класу генів, який називається генами протеїнів масляних тіл, зокрема, олеозинів, на характерних властивостях яких засновано заявлений спосіб отримання рекомбінантних протеїнів, при якому протеїн, що викликає інтерес, можна легко відокремити від інших компонентів клітки-хазяїна. Спосіб полягає в тому, що рекомбінантний поліпептид експресується у формі рекомбінантного злитого поліпептиду, що містить протеїн масляного тіла та протеїн, що викликає інтерес. Далі спосіб включає

розподіл злитого поліпептиду в ліпідну фазу, що містить масляні тіла. Масляні тіла далі легко відокремити від іншого клітинного матеріалу. Поліпептид, що викликає інтерес, виділяють, обробляючи злитий протеїн протеазой, яка здатна розпізнавати протеолітичний сайт розпізнавання протеїну масляного тіла, найближчий до N-кінця поліпептиду, що представляє інтерес. Запропоновано також хімерна ДНК, експресуюча касета і культура рослинних кліток для здійснення зазначеного способу, а також спосіб виготовлення їжі на основі модифікованого насіння рослин.

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному способу получения представляющих интерес протеинов, которые легко выделять из компонентов клеток хозяев. Способ иллюстрируется экспрессией представляющего интерес протеина в растениях, особенно в семенах, в форме химерного пептида, содержащего протеин масляного тела и представляющий интерес протеин.

В растениях были экспрессированы различные протеины. Однако, хотя и была продемонстрирована общая доступность осуществления экспрессии чужеродных протеинов в растениях, получение очищенных протеинов из таких источников имеет некоторые ограничения. Эти ограничения включают стадию очистки, необходимую для получения чистого протеина, практически не содержащего растительных материалов и продуктов разложения, которые могут образовываться в экстрактах, полученных в процессе очистки, когда полученные рекомбинантные протеины контактируют с водными буферами.

Растения, имеющие масличные семена, такие как соя, рапс, подсолнечник и ряд других видов растений, таких как кукуруза, морковь и т. д., хранят в своих семенах триглицериды. В растениях эти триглицериды выполняют роль источника энергии для прорастания семян и последующего роста сеянца. Триглицериды широко используют в качестве растительных масел в пище и пищевых продуктах, а также в некоторых областях промышленности.

Триглицериды не смешиваются с водой и выделяются за счет флотации на поверхности водных растворов или образуют небольшие глобулы или липосомы в виде суспензии в водной фазе. Такие глобулы естественно сливаются, если они не стабилизированы модифицированным поверхностным слоем. Такое слияние может привести к образованию суспензии из глобул случайного размера. В семенах же при сохранении триглицеридов масляные глобулы на деле представляют собой капсулированные липидные или масляные тела обычно одинакового размера. С поверхностью этих масляных тел ассоциированы полуфрагменты (half unit) мембран, усыпанные несколькими протеинами, которые обычно называют протеинами масляного тела.

По крайней мере, один класс протеинов масляного тела имеет несколько характеристик, которые существенно консервативны от вида к виду. Этот класс протеинов масляного тела называют "олеозинами". Гидрофильные N- и C- концы этих протеинов, по-видимому, совершенно различны, тогда как липофильные внутренние участки (центральное ядро), по-видимому, строго консервативны для, различных видов. Олеозины прочно связаны с масляными телами, эта прочная связь с масляными телами может быть, в основном, связана с липофильным характером этих центральных ядер. Поэтому представляет интерес определение возможности использования таких протеинов масляного тела, как олеозины, для создания средств для выделения рекомбинантных протеинов из растительных материалов.

Продуцирование чужеродных (рекомбинантных) пептидов в растениях было исследовано с использованием различных подходов, включая транскрипционные слияния с применением сильного конститутивного растительного промотора (например, из вируса мозаики цветной капусты - Slemens et al. (1990) *Bio/Technology*, 8: 217 - 221) и кодирование чужеродного протеина; транскрипционные слияния с органоспецифическими последовательностями (Radke et al. (1988) *Theoret. Appl. Genet.*, 75: 685 - 694); и трансляционные слияния, которые требуют последующего отщепления рекомбинантного протеина (Vander Kerkove et al, (1989) *Bio/Technology*, 7: 929 - 932). Чужеродные протеины, которые были экспрессированы в растительных клетках, включают активные протеины из бактерий (Pralei et al. (1983) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 80: 4803 - 4807), животных (Mlaga and Gedamu (1989) *Theor. Appl. Genet.*, 78: 161 - 168), грибов и других видов растений (Fralei et al. (1983) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 80: 4803 - 4807).

Некоторые протеины, обычно маркеры интеграции, были экспрессированы тканеспецифическим образом, причем некоторые были экспрессированы в семенах (Sen Gupta et al. (1985) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 82: 3320 - 3324); Radke et al. (1988) *Theor. Appl. Genet.*, 75: 685 - 694). Эти сообщения концентрируются специфически на использовании промоторов протеинов хранения семян как средства обеспечения специфической для семян экспрессии. Используя эти системы, Vanderkerkove et al. (1989) *Bio/Technol.*, 7: 929 - 932, экспрессировал очень ценный пептид (leu-энкефалин) В семенах *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. Выход этих пептидов чрезвычайно низок, но он демонстрирует возможность экспрессии пептидного гормона животного в ткани растения. Олеозин кукурузы был экспрессирован в масляных телах семян *Brassica napus*, трансформированных геном олеозина кукурузы. Этот ген был экспрессирован под контролем регуляторных элементов из гена *Brassica*, кодирующего налин (napIn), основной протеин хранения семян. Как сообщается, временная регуляция и тканеспецифичность экспрессии правильны для промотора/терминатора гена напина. См. Lee et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, (1991) 88: 6181 - 6185. Масляные глобулы, которые образуются в семенах, по-видимому, все одинакового размера, что указывает на их стабилизацию (Huang A. H. C. (1985) в *Modern Meths. Plant Analysis* N.1: 145 - 151 Springer-Verlag, Berlin). При более тщательном исследовании было обнаружено, что они представляют собой не просто масляные глобулы, а скорее масляные тела, окруженные мембраной. Такие масляные тела называли по разному электронные микроскописты: олеосомы, липидные тела и сферосомы (Gurr MI (1980) в *The Biochemistry of Plants*, 4: 205 - 248, Acad. Press, Orlando, Fla). Были исследованы масляные тела нескольких видов, и пришли к выводу, что они заключены в необычные "полу-фрагментарные" мембраны, которые представляют собой не классический липидный би-слой, а скорее один амфифильный слой с гидрофобными группами с внутренней стороны и гидрофильными группами с внешней (Huang A. H. C. (1985) в *Modern Meths. Plant Analysis*, vol. 1: 145 - 151 Springer-Verlag, Berlin).

Анализ содержания липидных тел продемонстрировал, что помимо триглицеридов и материала мембран

они содержат также несколько полипептидов/протеинов, связанных с поверхностью или полостью масляного тела (Bowman-Vance and Huang (1987), J. Biol. Chem. 262: 11275 - 11279, Murphy et al. (1989) Biochem. J, 258: 285 - 293, Taylor et al. (1990) Planta, 181: 18 - 26). Протеины масляных тел были идентифицированы для широкого круга таксономически различных видов (Moreau et al, (1980) Plant Physiol., 65: 1176 - 1180; Qu et al, (1986) Biochem. J., 235: 57 - 65), и было показано, что они расположены только в масляных телах, но не были обнаружены в органеллах растительных тканей. В Brassica napus (семена рапса) имеются, по крайней мере, три полипептида, связанные с масляными телами в развивающихся семенах (Taylor et al. (1990), Planta, 181: 18 - 26). Количество и размеры протеинов, связанных с масляными телами, могут меняться от вида к виду.

Так например, в кукурузе существуют два иммунологически различных класса полипептидов, обнаруженных в масляных телах (Bowman-Vance and Huang (1988) J. Biol. Chem. 263: 1476 - 1481).

Было показано, что олеозины содержат участки чередующейся гидрофобности и гидрофильности (Bowman-Vance and Huang (1987) J. Biol. Chem., 262: 11275 - 11279). Аминокислотные последовательности олеозинов из кукурузы, семян рапса и моркови были получены. См. Qu and Huang (1990) J. Biol. Chem., 265: 2238 - 2243, Hatzopoulou et al (1990) Plant Cell., 2: 457 - 467, соответственно. В таких семенах масличных как рапс, олеозин может составлять от 8% (Taylor et al. (1990) Planta, 181: 19 - 26) до 20% (Murphy et al. (1989) Biochem. J, 258: 285 - 293) от полного содержания протеина в семенах. Столь высокое содержание сопоставимо с тем, что было обнаружено для многих протеинов хранения семян.

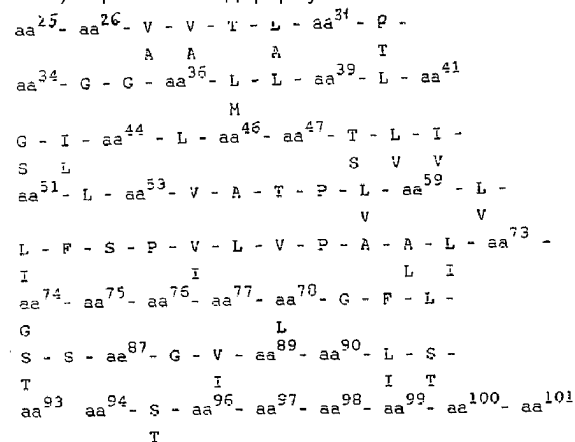
Сообщалось, что получены гены, кодирующие протеины масляных тел, для двух видов: кукуруза (Zea mays, Bowman-Vance and Huang (1987) J. Biol. Chem., 262: 11275 - 11279; и Qu and Huang (1990), J. Biol. Chem, 265: 2238 - 2243) и морковь (Hatzopoulos et al. (1990) Plant Cell., 2: 457 - 467).

Предложены способы и композиции для осуществления этих способов получения пептидов, которые можно легко выделить из протеинов хозяев. Этот способ включает стадии получения химерной конструкции ДНК, которая включает последовательность, кодирующую специфическую последовательность масляного тела, содержащую кодирующую последовательность гена протеина масляного тела, специфического для семян, или последовательность, кодирующую, по крайней мере, участок гидрофобного ядра протеина масляного тела, и последовательность, кодирующую нужный пептид, из которых можно получить кассету экспрессии, содержащую химерную конструкцию ДНК; трансформация клеток хозяина кассетой экспрессии в условиях геномной интеграции; и выращивания полученного трансгенного растения до получения семян, в которых нужный полипептид экспрессирован как протеин слияния с олеозином.

Представляющий интерес полипептид можно очистить, выделяя масляные тела из клеток семян, разрушая масляные тела, так что при этом высвобождается протеин слияния. Затем протеины масляного тела легко отделяются от других протеинов и полученных из растений материалов за счет разделения фаз. При желании сайт расщепления может быть расположен, по крайней мере, перед N-концом или после C-конца представляющего интерес полипептида, что обеспечит возможность отщеплять полипептид слияния и выделять его за счет фазового разделения на составляющие его пептиды. Таким образом, создана система, обеспечивающая целенаправленный перенос химерного пептида за счет функциональности протеина его масляного тела к масляным телам, что, в свою очередь, позволяет быстро очистить представляющий интерес полипептид. Эта система получения находит применение при получении многих пептидов, например, таких пептидов, которые обладают нужными фармацевтическими, энзиматическими, реологическими и адгезивными характеристиками.

В соответствии с настоящим изобретением предложен полипептид слияния, отличающийся тем, что может быть обеспечена его доставка к масляному телу, содержащий:

а) первый пептид формулы:



при условии, что указанный первый пептид отлетается от полноразмерного природного 16Kb олеозина из моркови, или 16Kb или

16Kb олеозина из кукурузы, и где

aa²⁵ представляет любую аминокислоту;

aa²⁶ представляет нейтральную алифатическую аминокислоту;

aa³¹ представляет нейтральную незамещенную алифатическую аминокислоту, состоящую из 3 - 6 атомов углерода;

aa³³ представляет нейтральную незамещенную алифатическую аминокислоту, содержащую 3 - 6 атомов углерода;

aa³⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту, содержащую 3 - 5 атомов углерода;

aa³⁷ представляет нейтральную незамещенную аминокислоту;

aa³⁹ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту;

aa⁴¹ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту;

aa⁴⁴ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту;

aa⁴⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту или оксизамещенную аминокислоту;

aa⁴⁷ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту;

aa⁵⁹ представляет нейтральную алифатическую или ароматическую незамещенную аминокислоту;

aa⁷⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или тиозамещенную -аминокислоту;

aa⁷⁸ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту;

aa⁸³ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту;

aa⁹² представляет нейтральную алифатическую аминокислоту с оксизамещением;

aa⁹⁶ представляет нейтральную алифатическую тиозамещенную аминокислоту или нейтральную ароматическую гетероциклическую аминокислоту;

aa⁹⁷ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или тиозамещенную аминокислоту;

aa⁹⁸ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту или ароматическую оксизамещенную аминокислоту;

aa⁹⁹ представляет любую аминокислоту;

aa¹⁰⁰ представляет оксизамещенную аминокислоту, либо алифатическую, либо ароматическую;

aa¹⁰¹ представляет нейтральную незамещенную алифатическую или ароматическую аминокислоту; слитый с

b) вторым пептидом, при условии, что этот второй пептид отличается от части природного олеозинового протеина из Arabidopsis или Brassica.

В настоящем изобретении предложен также полипептид слияния, характеризуемый как способный осуществлять целенаправленный перенос к масляному телу, содержащий:

a) первый пептид, выбранный из группы, состоящей из:

(1) пептида, содержащего, по крайней мере, восемь последовательных аминокислот, включенных в следующую аминокислотную последовательность:

M-M-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-
S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K-Y-
A-T-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-
S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-
E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T;

(2) пептид, который кодируется ДНК последовательностью, идентифицированной с помощью олигонуклеотидного зонда, сконструированного на основе указанной аминокислотной последовательности (1), или её фрагмента, при условии, что указанный первый пептид отличается от полноразмерного природного 16Kb олеозина из моркови или 18Kb или 16Kb олеозина из кукурузы, слитый с

b) вторым пептидом, при условии, что указанный второй пептид отличается от части природного олеозинового протеина из Arabidopsis ИЛИ Brassica,

Далее в настоящем изобретении предложена химерная ДНК конструкция, содержащая:

a) первую ДНК последовательность, кодирующую олеозин или его часть, достаточную для обеспечения целенаправленного переноса к масляному телу, и

b) вторую ДНК последовательность, кодирующую пептид, при условии, что указанный пептид отличается от части природного олеозинового протеина из Arabidopsis ИЛИ Brassica.

Далее в настоящем изобретении предложена кассета экспрессии, содержащая:

в качестве компонентов в направлении транскрипции:

регуляторную ДНК последовательность, содержащую достаточную часть участка 5' до сайта начала трансляции гена, экспрессируемого в семенах, для обеспечения экспрессии ДНК последовательности в семенах;

химерную ДНК последовательность, содержащую

a) первую ДНК последовательность, кодирующую олеозин, или достаточную её часть для обеспечения целенаправленного переноса к масляному телу, причем указанная ДНК последовательность включает, по крайней мере, один рестрикционный сайт, и

б) вторую ДНК последовательность, кодирующую пептид, при условии, что указанный пептид отличается от природного олеозинового протеина из *Arabidopsis* или *Brassica*; и

участок окончания трансляции и транскрипции;

где указанные компоненты операбельно связаны, а экспрессия указанной химерной последовательности ДНК регулируется указанной регуляторной ДНК последовательностью.

В настоящем изобретении предложена также кассета экспрессии, содержащая:

ген протеина масляного тела (oil body protein = OBP), который включает достаточную часть участка 5' до сайта начала трансляции для обеспечения экспрессии указанного гена в клетки семян, и который включает, по крайней мере, один рестрикционный сайт между 5'-концом кодона инициации метионина, и 5'-сигналом окончания трансляции указанного ОВР гена, и

ДНК последовательность, встроенную в указанный рестрикционный сайт в рамке считывания с указанным ОВР геном, где указанная ДНК последовательность кодирует пептид, который отличается от части нативного олеозинового протеина из *Arabidopsis* или *Brassica*.

В настоящем изобретении предложена также кассета экспрессии, содержащая:

первую ДНК последовательность, кодирующую пептид, при условии, что указанный пептид отличается от части природного олеозинового протеина из *Arabidopsis* или *Brassica*, встроенную в рамке считывания в ген протеина масляного тела, которая включает достаточную часть регуляторного участка 5' до сайта начала трансляции указанного ОВР гена для обеспечения экспрессии указанного гена в семенах, где указанная последовательность встроена по такому сайту указанного гена, чтобы быть экспрессированной под контролем указанного регуляторного участка.

В настоящем изобретении предложен способ достижения экспрессии целевого пептида в семенах, причем указанный способ включает трансформацию клеток растения - хозяина экспрессионной кассетой в условиях геномной интеграции, где указанная кассета экспрессии содержит в качестве компонентов, в направлении транскрипции, первую ДНК последовательность, содержащую достаточную часть участка 5' до сайта начала трансляции гена, экспрессируемого в семенах, для обеспечения экспрессии ДНК последовательности в семенах, вторую ДНК последовательность, кодирующую олеозин или достаточную его часть, для обеспечения нацеленного переноса к масляному телу, причем указанная вторая ДНК последовательность включает, по крайней мере, один природный или синтетический рестрикционный сайт, в который встроена в рамке считывания третья ДНК последовательность, кодирующая целевой пептид, при условии, что указанный пептид отличается от части природного олеозинового протеина из *Arabidopsis* или *Brassica*; и участок окончания трансляции и транскрипции; где указанные компоненты операбельно связаны, и экспрессия указанной второй ДНК последовательности регулируется указанной первой ДНК последовательностью, для обеспечения экспрессии в семенах.

В настоящем изобретении предложен способ получения очищенного целевого пептида, причем указанный способ включает:

трансформацию клеток растения хозяина ДНК конструкцией в условиях геномной интеграции, где указанная ДНК конструкция содержит первую ДНК последовательность, кодирующую целевой пептид, при условии, что указанный пептид отличается от части природного олеозинового протеина из *Arabidopsis* или *Brassica*, встроенную в считывающую рамку гена протеина масляного тела, которая содержит достаточную часть регуляторного участка 5' до сайта начала трансляции указанного ОВР гена для обеспечения экспрессии указанного гена в семенах, причем указанная последовательность встроена по такому сайту указанного гена, что экспрессия указанной ДНК последовательности контролируется, указанным регуляторным участком, за счет чего указанная ДНК конструкция интегрируется в геном указанных клеток растения;

выращивание указанного растения до получения семян, в которых целевой пептид экспрессирован как протеин слияния с продуктом экспрессии указанного ОВР гена;

выделение масляных тел из клеток указанных семян;

разрушение указанных масляных тел, в результате чего выделяется указанный протеин слияния; и

очистку указанного целевого пептида.

Краткое описание чертежей

Фиг.1А представляет нуклеотидную последовательность и выведенную аминокислотную последовательность (17кДа протеин) гена протеина масляного тела (олеозина) из *Arabidopsis thaliana*. Подчеркнуты прямые повторы (R_1 и R_2) и инвертный повтор (T), CACA, TATA, TAAT и сигналы полиаденилирования.

Интронная последовательность напечатана мелким шрифтом, а предполагаемый АВА-связывающий сайт указан жирным шрифтом.

На фиг.1В представлено сравнение последовательностей протеина 16Kb масляного тела из моркови и 18Kb и 16Kb протеинов масляного тела из кукурузы и 17Kb протеина масляного тела из *Arabidopsis thaliana*, где показаны сохраняющиеся (консервативные) и различающиеся участки этих протеинов; аминокислотные последовательности выровнены, чтобы показать консервативность последовательности в центральном участке протеинов.

На фиг.2 представлены конструкции, использованные для слияния генов протеинов масляного тела с генами, кодирующими чужеродные пептиды. IA представляет С-терминальное слияние целевого пептида с ОВР; IB представляет N-терминальное слияние целевого пептида с ОВР; II представляет внутреннее слияние целевого пептида с ОВР; и III представляет меж-димерное трансляционное слияние целевого пептида, заключенного между двумя практически полными последовательностями протеина масляного тела,

обеспечивающими его направленную доставку. В верхней части фиг.(А) представлена ДНК конструкция, использованная для трансляционного слияния целевых пептидов с протеинами масляного тела. В нижней части фиг.(В) представлены конфигурации генных продуктов, показанных на верхнем участке трансляции и доставки к

масляным телам. Ключ к фиг. следующий:

заштрихованный снизу слева вверх направо прямоугольник представляет ОВР промотор.или другой специфический для семян промотор; заштрихованный снизу справа вверх налево прямоугольник представляет последовательность, кодирующую целевой пептид; не заштрихованный прямоугольник представляет последовательность, кодирующую протеин масляного тела или синтетическую последовательность, обеспечивающую направленную доставку, основанную на ОВР консервативных фрагментах; заштрихованные в клеточку прямоугольники представляют терминатор гена, содержащий сигнал полиаденилирования; заштрихованный кружок представляет фрагмент распознавания протеазы; спиральная линия представляет нативный С- или F -конец ОВР.

Фиг.3 представляет подробную структуру конструкции С-терминального слияния. Изображена структура последовательности, кодирующей участок распознавания коллагеназы, в качестве линкера при слиянии типичного гена протеина масляного тела и пептида слияния, который нужно связать, используя *l*ί_{soi}, для клонирования и экспрессии в растениях.

На фиг.4 схематически представлен процесс конструирования векторов пептида слияния, их введение в растения и последующую экстракцию и анализ целевого рекомбинантного пептида.

На фиг.5 схематически представлено конструирование rCGBPILT. Прямоугольник с пунктиром представляет олеозиновый промотор; прямоугольник, заштрихованный сверху слева-вправо вниз представляет олеозиновую кодирующую последовательность; заштрихованный в клеточку прямоугольник представляет интрон; прямоугольник со штрихами представляет 3'-нетранслируемую последовательность; , прямоугольник с редко расположенными полосами сверху слева - вправо вниз, представляет последовательность интерлейкина-1-β, снабженную последовательностью, кодирующей сайт расщепления протеазы (Фактор Ха или тромбин, расположенный непосредственно в обратном направлении).

На фиг.6 представлена конструкция олигонуклеотида GYRII. На фиг.3А представлена 3' кодирующая последовательность *A. thaliana* oleosin, трансляционно считая с кодирующей последовательностью фактора Ха/IL-1-β, после которой следует TAA стоп-кодон. Для целей дальнейшего кодирования включают PvuI и salI рестрикционные сайты. Создание PvuI рестрикционного сайта приводит к дополнительной кодирующей последовательности для аланина (ala). Подчеркнуты последовательности распознавания рестрикционного энзима. Друг над другом расположены последовательности олеозина *A. thaliana* и последовательность распознавания фактора Ха. Действительный сайт расщепления обозначен звездочкой. На фиг.3В представлена последовательность GYRII для осуществления слияния с *A. thaliana* олеозином, праймер GVHII должен быть комплементарен последовательности верхней нити.

На фиг.7 представлена нуклеотидная последовательность OBPILT. Подчеркнута последовательность, кодирующая IL-1- β; последовательность, кодирующая сайт распознавания фактора Ха, указана жирным шрифтом. Терминаторная последовательность нопалин-синтетазы указана мелкими буквами.

Описание, предпочтительного варианта

В соответствии с целью изобретения предложены способы и композиции для получения пептидов, которые легко поддаются очистке. Целевой способ включает стадии получения экспрессионной кассеты, содержащей ДНК последовательность, кодирующую достаточную часть специфической последовательности масляного тела, например, олеозина, для обеспечения направленного транспорта к масляному телу, и представляющий интерес пептид;..трансформации экспрессионной кассетой клеток растения хозяина; создания трансгенного растения и выращивания его для получения семян, в которых химерный протеин экспрессирован и перемещен к масляным телам. Химерный пептид включает целевой пептид и такой протеин масляного тела, как олеозин. Целевой пептид обычно является чужеродным пептидом, который обычно не экспрессируется в семенах или не находится на масляных телах. Использование протеина масляного тела в качестве носителя или в качестве средства для направленной доставки обеспечивает простой механизм очистки чужеродного протеина. Химерный протеин выделяют из массы клеточных протеинов в одну стадию (например, за счет центрифугирования или флотации); этот протеин также защищен от разложения в процессах экстракции, так как при разделении удаляются неспецифические протеазы из контакта с масляными телами. Ген, кодирующий чужеродный пептид, может быть получен из любого источника, включая растительные, бактериальные, грибковые или животные источники.

Желательно, чтобы химерный пептид содержал последовательности, которые позволяли бы отщеплять целевой пептид от олеозина. Такой метод можно использовать для экспрессии различных пептидов, которые затем легко поддаются очистке.

Обеспечение направленной доставки чужеродного рекомбинантно-го протеина к масляному телу обеспечивает несколько преимуществ, включая следующие. Протеин можно выделить из клеточной массы после лизиса, клеток за счет центрифугирования. Частицы масляных тел будут плавать на поверхности экстракта. Протеин можно необязательно снабдить пептидным линкером, содержащим сайт распознавания протеазы. Это позволяет отделить пептид от масляного тела. Протеин можно ввести в рекомбинантный полипептид таким образом, чтобы он был внутри липофильного консервативного участка.. Это приводит к интернализации рекомбинантного пептида в масляное тело, таким образом защищая его от атаки протеазы.

Экспрессионная кассета обычно будет включать в 5' - 3' направлении транскрипции, транскрипционный и трансляционный регуляторный участок, обеспечивающие возможность экспрессии в развивающихся семенах,

служат типичным примером которых промотор, и расположенные в обратном направлении участки, связанные с протеином масляного тела, что обеспечит экспрессию химерного протеина в семенах. ДНК последовательность, кодирующую химерный пептид, содержащий аминокислотную последовательность для обеспечения направленной доставки к масляному телу и целевой протеин, транскрипционный и трансляционный терминальные участки функциональные в растениях. Может также присутствовать один или более из интронов.

Специфическая последовательность масляного тела встречается аналогию во фрагментах протеинов масляного тела, в частности, олеозинов. Специфическая последовательность масляного тела может быть той же, что и последовательность, получаемая из протеина масляного тела, и они имеют, достаточную гомологию, чтобы, обеспечить направленную доставку целевого протеина к масляному, телу. Под "получаемой" подразумевают аминокислотную последовательность, которая может быть природной, синтетической или комбинированной, достаточно близкой к аминокислотной последовательности протеина нативного масляного тела, для достижения нужного обеспечения направленной доставки. Особый интерес представляют центральный гидрофобный домен протеинов масляного тела, который, по-видимому, в высшей степени консервативен среди различных видов растений, и его фрагментов и гомологичных последовательностей на аминокислотном уровне.

Выведенная последовательность аминокислот для *Arabidopsis thaliana* протеина масляного тела следующая:

```

10      10      20      30      40
M-H-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-
      50      60
S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
      70      80
S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
      90     100
I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
     110     120
L-S-S-G-G-F-C-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K*Y-
     130     140
A-I-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-
     150
S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-
     160
E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T

```

Аминокислоты от около 25 до 101 содержат центральный гидрофобный домен.

Особый интерес представляют в качестве средств, обеспечивающих направленную доставку для некоторых применений, специфические последовательности масляного тела или их фрагменты следующей формулы, которые обеспечивают направленную доставку к масляному телу:

```

pp1 - aa25 - aa26 - V - V - T - L - aa31 - P -
              A   A   A   T
aa34 - G - G - aa36 - L - L - aa39 - L - aa41 -
              H
G - I - aa44 - L - aa46 - aa47 - T - L - I -
S   L
aa51 - L - aa53 - V - A - T - P - L - aa59 - L -
              V   V
L - F - S - P - V - L - V - P - A - A - L - aa73 -
I   I   I   L   I
aa74 - aa75 - aa76 - aa77 - aa78 - G - F - L -
G
S - S - aa87 - G - L - aa89 - aa90 - L - S -
T   I   I   T
aa93 aa94 - S - aa96 - aa97 - aa98 - aa99 -
T
aa100 - aa101 - pp2

```

где

pp¹ и pp² одинаковы или различны, и могут быть такими же, или могут отличаться от природного протеина масляного тела, и обычно отличаются; они могут представлять водорода, что указывает на терминальную часть указанного полипептида, или они могут быть полипептидами, содержащими вплоть до 1000 аминокислот,

обычно вплоть до около 500 аминокислот, и могут содержать лишь одну аминокислоту, или могут индивидуально или раздельно быть полипептидами, содержащими от 1 до 100 аминокислот, обычно от около 1 до 75 аминокислот, и.особенно от около 5 до 50 аминокислот; эти полипептиды могут иметь специфические.применения при модификации специфически описанных последовательностей для заранее определенных целей;

aa²⁵ может быть любой аминокислотой, в частности, нейтральной алифатической аминокислотой, обычно содержащей от 3 до 6 атомов углерода, более конкретно, лейцином или аланином;

aa²⁶ представляет нейтральную алифатическую аминокислоту, особенно аланин или гидроксизамещенную аминокислоту, содержащую от 3 до 4 атомов углерода, в частности, треонин, или основную аминокислоту, содержащую от 5 до 6 атомов углерода, в частности, лизин;

aa³¹ представляет нейтральную незамещенную алифатическую аминокислоту, содержащую от 3 до 6 атомов углерода, в частности, аланин, валин или лейцин, или ароматическую незамещенную аминокислоту, особенно фенилаланин;

aa³³ представляет нейтральную незамещенную алифатическую аминокислоту, содержащую от 3 до 6 атомов углерода, особенно аланин, валин или лейцин, или оксизамещенную алифатическую аминокислоту, особенно треонин;

aa³⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту, содержащую от 3 до 5 атомов углерода, особенно лейцин, или нейтральную алифатическую оксизамещенную аминокислоту, содержащую от 3 до 4 атомов углерода, особенно треонин или серин;

aa³⁷ представляет нейтральную незамещенную аминокислоту, особенно лейцин или тиозамещенную аминокислоту, особенно метионин;

aa³⁹ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту, особенно валин, или ароматическую незамещенную. аминокислоту, особенно фенилаланин;

aa⁴¹ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту, особенно, аланин, лейцин или серии;

aa⁴⁴ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту, в частности, аланин, изолейцин или треонин;

aa⁴⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту или оксизамещенную аминокислоту, особенно аланин, валин или треонин;

aa⁴⁷ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту, особенно глицин или аланш;

aa⁵⁹ представляет нейтральную алифатическую или ароматическую незамещенную аминокислоту, особенно лейцин или фенилаланин;

aa⁷⁶ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или тиозамещенную аминокислоту, особенно аланин, лейцин или метионин;

aa⁷⁸ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту, особенно аланин, или нейтральную алифатическую аминокислоту, содержащую тио- или окси-замещения, особенно метионин или третонин;

aa⁸³ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или оксизамещенную аминокислоту, особенно глицин, серии или треонин;

aa⁹² представляет нейтральную алифатическую аминокислоту с окси-замещением, особенно серии или треонин;

aa⁹⁶ представляет нейтральную алифатическую тиозамещенную аминокислоту или нейтральную ароматическую гетероциклическую аминокислоту, особенно триптофан;

aa⁹⁷ представляет нейтральную алифатическую незамещенную или тио-замещенную аминокислоту, особенно валин, лейцин, изолей-цин или метионин;

aa⁹⁸ представляет нейтральную алифатическую незамещенную аминокислоту или ароматическую оеки-замещенную аминокислоту, особенно аланин, лейцин или тирозин;

aa⁹⁹ может представлять любую аминокислоту;

aa¹⁰⁰ представляет окси-замещенную аминокислоту, либо алифатическую, либо ароматическую, особенно тирозин или треонин;

aa¹⁰¹ представляет нейтральную незамещенную алифатическую или ароматическую аминокислоту, особенно аланин, лейцин или фенилаланин.

Особый интерес в качестве источника ДНК, кодирующей последовательности, способные обеспечить направленную доставку к протеину масляного тела, представляют гены протеинов масляных тел, получаемые из Arabldops1s или Brassica napus, которые обеспечивают экспрессию целевого протеина в семенах (См. Taylor et al., (1990), Planta 181: 18 - 26). Нужные участки и аминокислотные последовательности, необходимые для обеспечения способности направленной доставки к масляным телам, должны быть, невидимому, существенно гидрофобным центральным участком протеинов масляного тела.

Для идентификации других генов протеинов масляного тела, обладающих нужными характеристиками, где протеин масляного тела уже был выделен, этот протеин можно частично секвенировать, с тем, чтобы можно было сконструировать зонд для идентификации мРНК. Такой зонд особенно ценен, если он сконструирован таким образом, чтобы нацелить его к кодирующему району центрального гидрофобного домена, который в

высшей степени консервативен среди различающихся видов растений. Следовательно, ДНК или РНК зонд для этого участка может быть особенно полезен для идентификации кодирующих последовательностей протеинов масляного тела из других видов растений. Для дальнейшего повышения концентрации мРНК, можно получить кДНК и эту кДНК вычистить с мРНК или кДНК из клеток, продуцирующих немасляные тела. Оставшуюся кДНК можно затем использовать для зондирования генома для комплементарных последовательностей, используя соответствующие библиотеки, полученные из растительных клеток. Затем можно выделить последовательности, которые гибридизуются с кДНК в жестких условиях. В некоторых случаях, как указано ранее, использующих зонд гена протеина масляного тела (консервативный участок), зонд можно использовать непосредственно для скринирования геномной библиотеки кДНК и идентификации последовательностей, которые гибридизуются с зондом. Выделение можно также осуществить стандартным иммунологическим скринированием библиотеки экспрессии кДНК специфической для семян. Антитела можно легко получить к протеинам масляных тел, используя способы очистки и схемы получения антител, описанные Taylor et al. (Planta, (1990), 181, 18 - 26). Библиотеку экспрессии кДНК скринируют, используя антитела по способу Huynh et al. (1985 DNA Cloning, Vol.1, a Practical Approach, ed. D.M. Glover, IRL Press, pp. 49 - 78). Подтверждение структуры последовательности облегчается за счет высокого консерватизма, существующего в центральном гидрофобном участке (фиг.1). ДНК секвенирование по способу Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1977) 74: 5463 - 5467) или Maxam and Gilbert (1980), Meth. Enzymol, (1980) 65: 497 - 560) можно осуществить на всех предполагаемых клонках и осуществить поиски гомологов. Гомология последовательностей, кодирующих центральный гидрофобный домен, обычно составляет $\geq 70\%$, как на аминокислотном, так и на нуклеотидном уровнях между различающимися видами. Если доступно антитело, подтверждение идентичности последовательности можно осуществить в экспериментах отбора гибридов и трансляции из препаратов мРНК семян по способу Sambrook et al. (Molecular Cloning, (1990), 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, pp.8 - 49 до 8 - 51).

кДНК клоны, полученные из семян, можно скринировать, используя кДНК зонды, полученные из консервативных кодирующих участков любого доступного гена протеина масляного тела (например, Bowman-Vance and Huang (J. Biol. Chem., (1987) 262: 11275 - 11279). Отбирают клоны, которые обладают степенью гибридизации с ДНК семян, нежеле с кДНК семян. Скринирование повторяют для идентификации конкретной кДНК, связанной с масляными телами развивающегося семян, используя прямое скринирование антителами или отбор гибридов и трансляцию. мРНК, комплементарные специфическим кДНК, отсутствуют в других тканях, подвергавшихся тестированию. Затем кДНК используют для скринирования геномной библиотеки и отбирают фрагмент, который гибридизуется с нужной кДНК.

Для достижения экспрессии химерного гена в семена, участок, регулирующий начало транскрипции и участок, регулирующий начало трансляции нетранслируемых 5' последовательностей, "рибосомо-связывающие сайты", ответственные за связывание мРНК с рибосомами, и начало трансляции, получаемые из любого гена, предпочтительно экспрессируемого в семенах, могут быть использованы. Примеры таких генов включают гены протеинов хранения семян, например из напина (Josefsson et al., J. Biol. Chem., (1987) 262: 12196 - 12201; Scofield S. R. and Crouch M. L. J, Biol. Chem. (1987) 262: 12202 - 12208). Предпочтительно, чтобы участок был получен из протеина масляного тела (протеины масляных тел из Arabidopsis, моркови (Hatzopoulos et al., см. ранее) или кукурузы (Huang et al. 1987 и 1990 см. ранее). Такой участок обычно содержит, по крайней мере, 100bp 5' до начала трансляции последовательности, кодирующей структурный ген, вплоть до 2,5kb 5' до того же начала трансляции. Предпочтительно, чтобы все транскрипционные и трансляционные функциональные элементы участка, контролирующего инициацию, были получены или их можно было бы получить из одного и того же гена. Под выражением "можно получить" подразумевают ДНК последовательность, достаточно сходную с нативной последовательностью для того, чтобы обеспечить целевую специфичность, транскрипции ДНК последовательности, кодирующей химерный протеин. Она включает природные и синтетические последовательности и может быть комбинацией синтетических и природных последовательностей.

Уровень транскрипции должен быть достаточным для обеспечения такого количества РНК, которое способно обеспечить получение модифицированных семян. Под термином "модифицированные семена" подразумевают семена, обладающие заметно отличающимся фенотипом от фенотипа семян нетрансформированного растения того же вида, например, не содержащих рассматриваемой кассеты экспрессии в его геноме. Представляют интерес различные изменения в фенотипе. Эти изменения включают избыточную экспрессию протеина масляного тела или ОВР-накопление на масляном теле, или полученного химерного протеина в цитоплазме.

Представляющим интерес полипептидом может быть любой протеин, и они включают, например, энзим, антикоагулянт, нейропептид, гормон или адгезивный предшественник. Примеры протеинов включают интерлейкин-I-B, антикоагулянт Hirudin, энзим β -глюкуронидазу или одноцепочечное антитело, содержащее трансляционное слияние v_H или v_L , цепей иммуноглобулина. ДНК последовательность, кодирующая целевой полипептид, может быть синтетической или природной, или их комбинацией. В зависимости от характера источника ДНК кодирующей целевой полипептид, может оказаться желательным синтезировать ДНК последовательность с предпочтительными растительными кодо-нами. Предпочтительные растительные кодо-ны можно определить из кодовое, наиболее часто встречающееся в протеинах, экспрессируемых в больших количествах в конкретные виды растений, представляющих интерес в качестве растений-хозяев.

Используемый терминаторный участок должен быть преимущественно одним из обычных, так как во многих случаях терминационные участки, по-видимому, относительно взаимозаменяемы. Терминационный участок может быть нативным с участком иницирования транскрипции, может быть нативным с ДНК последовательностью, кодирующей целевой полипептид, или может быть получен из другого источника,

Удобные терлиначионные участки доступны из Т1-плазмид А. tumefaciens, такие как октопин-синтазные и нопалин-синтазные терминационные участки.

Лигирование ДНК последовательности, кодирующей обеспечивающую направленную доставку последовательность с геном, кодирующим целевой пептид, может осуществляться различными способами, включая терминальное слияние, внутреннее слияние и полимерное слияние. Во всех случаях такие слияния осуществляют таким образом, чтобы не прерывать считывающую рамку протеина масляного тела, и с тем, чтобы избежать каких-либо сигналов прекращения трансляции внутри или вблизи этих соединений. Различные типы терминальных и внутренних слияний представлены на фиг.2 наряду с представлением их конфигураций *In vivo*.

Во всех описанных случаях лигирование гена, кодирующего пептид, предпочтительно должно включать линкер, кодирующий протеазный мишеневой фрагмент. Это позволит осуществить выделение пептида после его экстрагирования в виде протеина слияния. Потенциальные сайты расщепления, которые можно использовать, являются распознающими фрагментами для тромбина (leu-val-pro-arg-gly) (Fujikawa et al., *Biochemistry* (1972) 11: 4892 - 4899), фактора Ха (phe-glu-gly-arg-aa) (Nagata et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, (1985) 82: 7252 - 7255) или коллагеназы (pro-leu-gly-pro) (Scholtissek and Groese *Gene* (1988) 62: 55 - 64).

За счет соответствующих манипуляций, таких как рестрикция, переваривание (chewing back) или заполнение липких концов для создания тупых концов, лигирование линкеров или т.п., комплементарные концы фрагментов можно получить соединением и лигированием. При проведении различных стадий используют клонирование с тем, чтобы умножить количество ДНК и обеспечить возможность анализа ДНК для того, чтобы убедиться, что операция прошла должным образом. Доступно множество векторов клонирования, когда вектор клонирования включает функциональную в *E. coli* систему репликации и маркер, который обеспечивает селекцию трансформированных клеток. Иллюстративные векторы включают pBR332, pUC серии, M13mp серии, PACYC184 и. д. Так, последовательность можно встроить в вектор по соответствующему рестрикционному сайту (сайтам), полученную плазмиду использовать для трансформации *E. coli* хозяина, вырастить в *E. coli* в соответствующей питательной среде, собрать клетки, провести лизис и выделить плазмиду. Анализ может включать анализ последовательности, рестрикционный анализ, электрофорез или т. п. После каждой манипуляции ДНК последовательность, которая должна быть использована в окончательной конструкции, может быть рестриктирована и соединена со следующей последовательностью, где каждая из частей конструкций может быть клонирована в ту же самую или в отличающуюся плазмиду.

Для введения ДНК в растительные клетки хозяина существует множество возможных методик. Так например, химерные ДНК конструкции можно вводить в клетки хозяев, полученные из двудольных растений, например, табака, и таких масличных видов, как *Brassica napus*, используя стандартные *Agrobacterium* векторы, по такой схеме трансформации, как например та, которая описана Moloney et al. *Plant Cell Rep.*, (1989) 8: 238 - 242 или Hinchey et al. *Bio. Technol.*, (1988) 6: 915 - 922; или другие методики, известные специалистам. Так например, использование Т-ДНК для трансформации растительных клеток интенсивно исследуется, и подробно описано в ЭРА №120516; Hoekema, B "The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kanter B. V., Alblasserdam, 1985, Chapter V, Knauf, et al., *Genetic Analysis of Host Range Expression by Agrobacterium*, B "Molecular Genetics of the Bacteria. Plant Interaction, Puhler, A. ed, Springer-Verlag, NY, 1983, p.245, and An et al., *EMBO J.* (1985), 4: 277 - 284.

Удобно эксплантаты культивировать с *A. tumefaciens* или *A. rhizogenes* для того, чтобы обеспечить перенос транскрипционной конструкции в растительные клетки. После трансформации с использованием *Agrobacterium*, растительные клетки диспергируют в подходящей селективной среде для отбора, выращивают до образования каллуса, проростки и молодые растения регенерируют из каллуса, выращивая в среде для образования корней. *Agrobacterium* хозяин будет содержать плазмиду, содержащую *Vir* гены, необходимые для переноса Т-ДНК в растительные клетки, и может содержать или не содержать Т-ДНК. Для инъекции электропорации (см. далее) обезоруженные Т1-плазмиды (не содержащие опухолевых генов, особенно Т-ДНК участка) можно вводить в растительные клетки.

Использование не-*Agrobacterium* методик позволяет использовать описанные здесь конструкции для осуществления трансформации и экспрессии в широкий круг однодольных и двудольных растений. Эти методики особенно подходят для таких видов, которые не дают результатов в *Agrobacterium* трансформационной системе. Другие методики для переноса генов включают биолизис (Sanford, *Trends In Biotech.* (1988) 6: 299 - 302), электропорацию (Fromm et al. (1985) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 82: 5824 - 5828; Riggs and Bates (1986), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 83, 5602 - 5606 или захват ДНК с помощью PEG (Potrykus et al. (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 199: 169 - 177).

В качестве клеток хозяев можно использовать клетки любых растений, имеющих семена, причем эти клетки получают из таких частей растений, как стебли, листья, корни или семена, или соответствующих виду репродуктивных структур. Клетки могут быть как выделенными клетками, так и частями растений, например, листовыми дисками. В специфических применениях, таких как с *Brassica napus*, клетки хозяева обычно получают из семядольных петиолей, как указано Moloney et al. *Plant Cell Rep.*, (1989) 8: 238 - 242). В других примерах с использованием коммерческих маслосодержащих семян, используют трансформацию семядолей в соевые эксплантаты (Hinchey et al. *Biotechnology*, (1988) 6: 915 - 922) и трансформацию стебля хлопка (Umbeck et al, *BIO-technology*, (1981) 5: 263 - 266).

После трансформации клетки, например, в виде дисков листьев, выращивают на селективной среде. После того, как начинают образовываться ростки, их отсекают и помещают на корнеобразующую среду. После достаточного развития корней растения переносят в почву. Затем предположительно трансформированные

растения тестируют на присутствие маркера. Осуществляют Саузерн-блоттинг на геномной ДНК, используя соответствующий зонд, например, *A. thaliana* олеозинный ген для доказательства интеграции целевой последовательности в геном клетки хозяина.

Экспрессионную кассету обычно соединяют с маркером для селекции в растительных клетках. Удобно, чтобы маркер был устойчивым к гербицидам, например, антибиотик, такому, как канамицин, G418, блеомицин, гигромицин, хлорамфеникол и т. п. Конкретным используемым маркером должен быть такой, который обеспечит селекцию трансформированных клеток при сравнении сметками, которые не содержат ДНК, которую вводили.

Пептид слияния в кассете экспрессии, сконструированной как указано ранее, экспрессируется, по крайней мере, предпочтительно, в развивающихся семенах. Соответственно, трансформированным растениям, выращенным в соответствии с принятыми способами, дают возможность завязать семена. См. например, McCormick et al. *Plant Cell Reports* (1986) 5: 81 - 84. Норзерн-блоттинг можно вести, используя соответствующий генный зонд с РНК, выделенной из ткани, в которой ожидается транскрипция, например, в эмбрионе семени. Затем размеры транскриптов можно сравнить с размерами, предсказанными для транскриптов протеина слияния.

Можно вырастить два или более поколений трансгенных растений, и либо опылить их пыльцой от того же трансформированного штамма, либо от других штаммов, контролируя в полученном гибриде нужные фенотипические характеристики для подтверждения того, что нужные фенотипические характеристики стабильно сохраняются и наследуются, а затем семена собирают для того, чтобы выделить представляющий интерес пептид, или для того, чтобы получить семена, обладающие новыми фенотипическими характеристиками.

Целевой протеин можно экстрагировать из семян, которые могут быть гомо- или гетерозиготными, для последующих испытаний, различными способами, которые включают использование водных, забуференных экстракционных сред и различные способы измельчения (размалывания, расклевывания, пульверизации) для разрушения клеток семян. Затем продукты экстракции можно разделить (например, центрифугированием или за счет седиментации) на три фракции: седимент, или нерастворимый осадок, водный супернатант и плавающую пленку, содержащую липид хранения семян и масляные тела. Эти масляные тела содержат как нативные протеины масляных тел, так и химерные протеины масляных тел, причем последние содержат чужеродные пептиды. Масляные тела выделяют из водорастворимых протеинов и повторно суспендируют в водном буфере.

Если в кассету экспрессии был включен линкер, содержащий фрагмент распознавания протеазы, тогда к повторно суспендированному буферу добавляют протеазу, специфичную для фрагмента распознавания, полученного в результате трансляции линкерной последовательности. Это приводит к выделению целевого пептида в водную фазу. Теперь в результате второй стадии центрифугирования снова получают плавающую пленку обработанных масляных тел с присоединенными к ним протеинами, и остается водный раствор целевого пептида. Этот целевой пептид можно осадить, химически модифицировать или лиофилизировать, в зависимости от предполагаемого применения.

В некоторых случаях применения нет необходимости отделять химерный протеин от протеинов масляного тела. Такие применения включают случаи, в которых пептид слияния включает энзим, который толерантен к N- или C-терминальному слиянию и сохраняет свою активность; такие энзимы могут быть использованы без дальнейшего расщепления и очистки. Химерный энзим-ОВР будет контактировать с субстратом как протеин слияния. Возможно также, при желании, провести очистку энзим-ОВР протеина слияния, используя иммуно-аффинную колонку, содержащую иммобилизованные антитела с высоким титром против ОВР (см. например, Taylor et al., (1990) ранее).

Возможно другое применение предмета изобретения. Так как ОВР содержат высокий процент протеинов семян, оказывается возможным снабдить семена для некоторых целей такими ценными свойствами, как высокое содержание лизина, метионина и т. д., просто обогащая протеин слияния нужными аминокислотами. Этот способ может найти применение особенно при модификации зерновых, которые прямо или косвенно используются для корма домашних животных, включая скот, птицу, а также для продуктов питания людей. Может оказаться возможным включать как пептид слияния, энзим, который облегчит последующую обработку масла или муки в обычных процессах измельчения и экстракции семян масличных растений, например, за счет включения термостабильного липид-модифицирующего энзима, который останется активным и при повышенных температурах измельчения, которые обычно наблюдаются в этом процессе обработки семян, и, тем самым, удастся повысить ценность экстрагированных триглицеридов или протеинов.

Другие применения протеинов слияния включают использование их для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным условиям. Так, например, с протеином масляного тела можно соединить инсектицидный протеин или часть иммуноглобулина, специфичного для сельскохозяйственных вредителей, такую как стенки клеток или мембран грибов, тем самым уменьшая опасность нападения на семена конкретных вредителей растений. Приводимые далее примеры представлены лишь в целях иллюстрации и не являются ограничивающими.

Экспериментальная часть

ПРИМЕР 1

Экспрессия терминальных слияния чужеродных пептидов с протеинами масляных тел

A. C-терминальные слияния

Геномный клон гена протеина масляного тела, содержащий, по крайней мере 100bp 5' до начала, трансляции, клонируют в плазмидном векторе, способном к репликации в подходящем бактериальном хозяине (например, pUC или pBR322 в *E. coli*). Рестрикционный сайт расположен в участке, кодирующем гидрофильную

С-терминальную часть гена. В 19kDa OBP этот участок простирается обычно от кодонов 125 до конца клона. Идеальный рестрикционный сайт является уникальным, но это не является абсолютно необходимым. Если в этом участке нет удобного рестрикционного сайта, его можно ввести за счет сайт-направленного мутагенеза, по Kunkel Proc. Nat'l, Acad. Sci. USA, (1985) 82: 488 - 492. Единственным основным ограничением по встраиванию этого сайта, является то, что он должен быть расположен в направлении 5' от трансляционного стоп сигнала OBP клона.

Получив такой мутантный клон, можно получить синтетический олигонуклеотидный адаптер, который содержит кодирующую последовательность для сайта распознавания протеазы, например; Pro-Leu-Gly-Pro или его мультимер. Это сайт распознавания для протеазы коллагеназы. Адаптер следует синтезировать такти образом, чтобы обеспечить: 4-основной выступ у 5' конца, совместимый с рестракционным сайтом 3' конца OBP клона, 4-основной выступ у 3' конца адаптера для облегчения жирования с последовательностью, кодирующей чужеродный пептид и дополнительными основаниями, при необходимости, чтобы обеспечить отсутствие сдвигов рамки в переходе между OBP кодирующей последовательностью, сайтом распознавания протеазы и последовательностью, кодирующей чужеродный пептид. Типичная конструкция такого слияния представлена на фиг.3. Представленный пример использует существующий XhoI сайт вблизи стоп кодона OBP моркови (Natzopoulos at al. Plant Cell, (1990) 2: 457 - 467. Его переваривают и он может быть лигирован с адаптером, сконструированным из двух описанных олигонуклеотидов. Этот адаптер образует прекрасный XhoI выступ на конце и не будет нарушать трансляционной рамки. Другой конец образует NcoI выступ, который выбирают произвольно (подходят любые отрезки из 6 оснований), ко который содержит ATG из целевого чужеродного пептида.

Окончательный продукт лигирования содержит, самое большее, полный OBP ген, последовательность, кодирующую фрагмент распознавания коллагеназы, и участок, кодирующий целевой пептид, причем все в единой считывающей рамке. Этот состоящий из трех частей фрагмент клонируют в Agrobacterium бинарную плазмиду (Bevan Nucl. Acld Res, (1984) 12: 8711 - 8721), такую как обычно используют для переноса чужеродной ДНК в растения (Praley et al. Proc. Nat'l, Acad. Sci. USA, (1983) 80: 4803 - 4807), и это используют для трансформации семян масличных растений, таких как рапс, используя способ Moloney et al. Plant Cell Rep., (1989) 8: 238 - 242) или аналогичную процедуру. Трансгенные растения могут быть получены из этого эксперимента по трансформации, и выращены до цветения. Затем получают семена растения в результате самоопыления.

Семенам дают вызреть (60 - 80 дней), а затем собирают и измельчают в водном экстракционном буфере (Taylor et al. Plant a, (1990) 181: 18 - 26). Полученную суспензию центрифугируют при 5000хg в течение 20 минут, в результате получают на поверхности пленку. Её снова выделяют и суспендируют при интенсивном встряхивании в коллагеназном аналитическом буфере (Scholtissek and Grosse, Gene (1988) 62: 55 - 64). Добавляют 5ед. коллагеназы, и суспензию инкубируют со встряхиванием в течение 4 часов. После этого суспензию снова центрифугируют при 5000хg в течение 20 минут. Удаляют поверхностную пленку, и определяют содержание протеина в водной фазе с помощью электрофореза на SDS-полиакриламидном геле. Если обнаруживают полосу приблизительно того же размера, что и нужный пептид, протеин можно осадить, используя сульфат аммония, концентрированно с использованием ультрафильтрации или лиофилизировать.

В. N-терминальное слияние

Гидрофильный N-терминальный конец протеинов масляных тел позволяет осуществить слияние пептидов с N-концом, обеспечивая при этом сохранение чужеродного пептида. на внешней поверхности масляного тела. Конфигурации таких слияний представлены на фиг.2IB.

Такую конфигурацию можно сконструировать из таких же исходных материалов, что были использованы для С-терминальных слияний, но необходима идентификация удобных рестрикционных сайтов вблизи начала трансляции гена протеина масляного тела. Удобный сайт можно создать для многих генов протеинов масляных тел без изменения в кодирующей последовательности за счет введения изменения одного основания сразу в направлении 5' к первому "ATG". В исследованных до настоящего времени протеинах масляных тел второй аминокислотой является аланин, кодон которого начинается с "G". Контекст последовательности представлен далее:

A-С переход	здесь	даёт	NcoI	сайт
-------------	-------	------	------	------

3' . . . TC TCA ACA ATG GCA . . . OBP моркови
3' . . . GC GCA GCA ATG GCG . . . 18 kDa OBP кукурузы

Изменение одного основания у аденина перед "ATG" даёт в обоих случаях ...CCATGG..., что представляет собой NcoI сайт. Таким образом модификация этого основания с помощью сайт-направленного мутагенеза по Kunkel (Proc. Nat'l. Acad. Sci, USA, (1985) 82: 488 - 492) даёт возможность подготовить этот клон для использования, предполагая, что в последовательности нет других NcoI сайтов.

Кодирующая последовательность для чужеродного пептида может потребовать изменения, которые обеспечат её дотирование непосредственно по NcoI сайту. Обычно это может потребовать изменения одного или двух оснований за счет сайт-направленного мутагенеза (Kunkel, 1985, ранее) для создания NcoI сайта около начала трансляции чужеродного пептида. Затем этот пептид иссекают из его вектора клонирования, используя NcoI и второй фермент, который разрезает вблизи остановки трансляции мишени. И снова, используя описанный ранее способ, второй удобный сайт можно ввести за счет сайт-направленного мутагенеза. Было предположено, Qu. and Huang (1990, ранее), что N-терминальный метионин может быть удален в процессинге протеина In vivo, и что аланин, который следует непосредственно в прямом направлении от него, может быть ацилирован.

Чтобы учесть эту возможность, может оказаться необходимым сохранить последовательность Met-Ala по N-терминальному концу протеина. Это легко осуществить, используя различные стратегии введения удобного рестрикционного сайта в кодирующую последовательность в Ala кодон или после него. Так например, за счет сайт-направленного мутагенеза последовательность можно модифицировать следующим образом:

3' ... TC TCA ACA ATG GCA GAA CGA GGC AAT TAT

изменить мутацией на

3' ... TC TCA ACA ATG GCA TGC CGA GGC GGC TAT

Такое изменение одного кодона позволяет ввести SphI сайт в кодирующую последовательность. Второе изменение, которое можно осуществить в том же цикле мутагенеза, превращает два основания в кодоне 6 до получения GGC, GCC, что представляет NarI сайт. Этот полученный в результате мутации ген можно затем раскрыть SphI и NarI до получения отрезка прямого клонирования, который исключает три кодона. В этот сайт можно ввести адаптор, содержащий 3' выступ с последовательностью CATG... (совместимую с SphI) go 5' выступ с противоположного конца.

Точная последовательность этого адаптера представлена далее:

SphI n раз NarI

CTACG	CCG CTC GGT CCG	GG
	GGC GAG GCA GGC	CCGC

Этот адаптер будет воссоздавать как SphI так и NarI рестрикционные сайты, которые можно использовать для диагностических целей. SphI сайт теперь можно использовать для раскрытия плазмиды и клон в рамке ДНК фрагмента, содержащего последовательность для нужного пептида. Затем следует проанализировать ориентацию клонирования за счет нарезания по любым несимметрично расположенным сайтам и NarI плазмиды.

Полученные из этих N-терминальных слияний конструкции могут быть типичными примерами IB фиг.2. Они должны содержать ОВР промоторную последовательность в первых нескольких кодонах ОВР гена, представляющего высокую ценность пептида с его собственной ATG в качестве стартового сигнала при необходимости, и остальную часть ОВР гена и терминатор.

Этот модифицированный ген вводят в бинарную Agrobacterium plasmidu (Bevan, (1984, ранее) и мобилизуют в Agrobacterium Трансформации осуществляют в соответствии с вышеприведенным описанием. Выделение ценного пептида из семян осуществляют по способу, описанному в разделе "С-терминальные слияния".

С. Внутренние трансляционные слияния

Третий тип слияний включает помещение кодирующей ценный пептид последовательности внутри кодирующей последовательности ОВР. Этот тип слияния требует той же стратегии, что и N-терминальное слияние, но может быть функциональным лишь при модификациях в участках с низкой консервативностью, так как считают, что участки с высокой степенью консервативности в этих ОВР существенны для обеспечения направленной доставки зрелого протеина.

Ключевое отличие в этом типе слияния состоит в необходимости фланкирующих сайтов распознавания коллагеназы для высвобождения протеина. Это означает, что вместо стандартной коллагеназной системы линкер/адаптер, описанной ранее, необходимо иметь линкер следующего вида:

Липкий n раз Рестрик- n раз Липкий

конец 1 конец 2

CCG CTC GGT CCG	Рестрик-	CCG CTC GGT
GGC GAG GCA GGC	ционный	GGC GAG GCA GGC
	сайт	

Липкие концы 1 и 2 будут использованы для клонирования адаптера в ОВР клон непосредственно. Затем встроенный рестрикционный сайт используют для введения последовательности, кодирующей ценный пептид, фланкированный рестрикционными сайтами или линкерами. Ориентацию контролируют, используя ассиметрично расположенный рестрикционный сайт в последовательности, кодирующей ценный пептид и один из двух рестрикционных сайтов, фланкирующих последовательность, кодирующую фрагмент распознавания коллагеназы.

Мобилизация этих конструкций в Agrobacterium plasmidu, а затем в растения идентична ранее описанной процедуре. Выделение ценного протеина из семян трансгенных растений несколько отличается тем, что после того, как масляные тела выделяют и промывают, может понадобиться удалить липиды с масляных тел для того, чтобы сделать доступными сайты распознавания коллагеназы, которые могут быть спрятаны внутри масляных тел в липидной фазе. Эта стадия может уменьшить некоторые преимущества использования протеинов масляных тел в качестве носителей, но может, с другой стороны, оказаться очень удобной для последовательностей протеинов, которые лабильны в водной среде или в растительных цитоплазмах.

Д. Интердимерные трансляционные слияния

Возможно, создать конструкцию, в которой целиком повторяется кодирующая последовательность ОВР.

Димерный протеин, получаемый из такой конструкции, может всё ещё содержать все необходимые факторы для обеспечения направленной доставки ОВР к масляным телам. Такая конструкция должна содержать

промоторный участок, полную или почти полную открытую рамку считывания для ОВР, но без остановки трансляции, и затем полную открытую считывающую рамку второго ОВР, на этот раз укомплектованного трансляционным "стоп" и терминаторным участком.

При конструировании этого химерного гена пару различающихся рестрикционных сайтов либо находят, либо создают в участке соединения этих двух копий. Эти сайты используют для обеспечения возможности введения такого линкера, как описанный ранее для внутренних трансляционных слияний. Линкеры содержат не только наборы фрагментов распознавания коллагеназы, но также внутренний рестрикционный сайт, в который вставляют последовательность, кодирующую представляющий высокую ценность протеин. Форма такой конструкции представлена на фиг.2III. Введение этой конструкции в *Agrobacterium*, а затем в растения осуществляется описанным ранее способом. Выделение представляющего высокую ценность протеина из семян трансформированных растений осуществляют по способу, описанному ранее для процедуры С-терминального слияния.

ПРИМЕР 2

Стратегия клонирования и экспрессии Интерлейкина-1В (IL-1-β) в результате слияния с олеозинами в растениях

А. Клонирование и секвенирование гена олеозина *Arabidopsis thaliana*

Ген олеозина *Brassica napus* (Murphy et al., (1991) *Biochim Biophys Acta* 1088: 86 - 94) используют для скринирования геномной библиотеки *A. thaliana* (cv. Columbia) в EMBL3A (Stratagene). В результате скринирования получают выделенный EMBL3A клон (λ2.1), содержащий 15kb геномный фрагмент из *A. thaliana*. Олеозин картируют внутри 6,6kb KpnI вставки, внутри этого 15kb фрагмента (фиг.5). 1,8kb NcoI/KpnI фрагмент, содержащий ген олеозина, шлеет тупой конец, и его субклонируют в SmaI сайт RFM13mp19. 1,8kb вставку переваривают подходящими рестрикционными энзимами и субклонируют в M13mp19 для секвенирования. Последовательность 1800kb гена олеозина *A. thaliana* представлен на фиг.1a. Все процедуры копирования осуществляют по Sambrook et al., (1989) (*Molecular Cloning: A laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

В. Конструирование олигонуклеотида, кодирующего IL-1β

IL-1-В состоит из 9 аминокислот (aa); val-gln-gly-glu-glu-ser-asn-asp-lys (Antonl et al., (1986) *J. Immunol.* 137: 3201 - 3204). Протеазный фактор Ха может расщепить последовательность протеина, которая содержит последовательность аминокислот Ile-glu-gly-arg. Расщепление происходит после аминокислоты arg. На основании этих последовательностей конструируют олигонуклеотид (GVRII, фиг.5), который содержит дополнительно к IL-1-В кодирующей последовательности, кодирующую последовательность для сайта расщепления фактора Ха, и 18 нуклеотидов 3' кодирующего участка *A. thaliana* олеозина (положения оснований 742 - 759). Сконструирована IL-1-β кодирующая последовательность, используя оптимальное использование кодона для *B. napus* и *A. thaliana* олеозина (таблица I)

Таблица 1
Использование кодонов *A. thaliana*¹ и *B. napus* олеозина²

TTT phe F 5	TCT ser S 8	TAT tyr Y 6	TCT cys C -
TTC phe F 3	TCC ser S 10	TAC tyr Y 11	TGC cys C -
TTA leu L -	TCC ser S 2	TAA och z -	TGA opa z -
TTG leu L 4	TGA ser S -	TAG amb z -	TGG trp w 2
CTT leu L 10	CCT pro p 3	CAT his H 4	CGT arg R 6
CTC leu L 11	CCC pro p 1	CAC his H 6	CGC arg R -
CTA leu L -	CCA pro p 4	CAA gln Q 4	CGA arg R 1
CTG leu L 6	CCG pro p 2	CAG gln Q 17	CGG arg R -
ATT ile I 7	ACT thr T 11	AAT asn N -	AGT ser S 5
ATC ile I 13	ACC thr T 14	AAC asn N 1	AGC ser S 3
ATA ile I 3	ACA thr Y 7	AAA lys K 5	AGA arg R 5
ATG met M 11	ACG thr T 5	AAG lys K 10	AGG arg R 3
GTT val V 11	GCT ala A 17	GAT asp D 8	GGT gly G 0
GTC val V 9	GCC ala A 2	GAC asp D 19	GGC gly G 9
GTA val V -	GCA ala A 10	GAA glu E 2	GGA gly G 14
GTG val V -	GCG ala A 2	GAG gly E 2	GGG gly G 5

¹ См. фиг. 1A

² Lee and Huang (1991) *Plant Physiol* 96: 1395-1397.

С. Создание *A. Thaliana* олеозин IL-1-В слияния. На основании последовательности:

5'CACACCAGGAACCTCTCTGGTAAGC3'

(положение оснований - 638 до - 814), олигонуклеотид GVR10

5'CACTGCAGGAACCTCTCTGGTAAGC3'

был сконструирован. GVR10 содержит PstI рестрикционный сайт (подчеркнут) для облегчения клонирования. Полимеразная цепная реакция (PCR) была использована для амплификации участка между GVR10 и GVR11. Реакционная смесь содержит: 16мкл dNTPs (1,25мМ), 10мкл 10X PCR буфер (100мМ Tris-HCl pH8,3, 500мМ KCl, 15мМ MgCl₂, 0,1% (вес/объем) желатин, 5мкл H₂O. Реакцию ведут в течение 30 циклов. Каждый цикл включает 1 минуту дешифрирования при 92°C, 1 минуту отжига при 45°C и 3 минуты удлинения при 72°C. В результате реакции PCR получают один фрагмент длиной 1652 нуклеотида.

Д. Клонирование *A. thaliana* олеозин-IL-1-В (OBPIL) слияния

5' Sall-нопаин-синтезную (nos) терминаторную EcoRI 3' последовательность выделяют из pBI121 (Clontech laboratories) и клонируют в Sal/EcoRI сайты pUC19. Плазмиду называют pTerm. Фрагмент 1652bp (описан в разделе C) выделяют и переваривают рестрикционными энзимами PstI и Sall. Этот фрагмент клонируют в pTerm. Полученную плазмиду называют pUCOBPILT (фиг.5). Эту плазмиду переваривают EeoRI и PstI, и получают в переваре pUC19 вектор и EcoRI-A. thallana олеозин-IL-1-B-nos-PstI слитый PstI (OBPILT). Полная последовательность OBPILT представлена на фиг.7. OBPILT субклонируют в EcoRI/PstI сайты pBluescript⁺. Эту плазмиду (pBIOBPILT) переваривают PstI и HindIII, и фрагмент PstI-OBPILT-HindIII субклонируют в бинарную *Agrobacterium* плазмиду (Bin19) (Bevan, M., (1984) Nucl. Acid. Res. 12: 8711 - 8721), содержащую селекционный маркер (неомицинфосфотрансферазу) и PstI-HindIII уникальные сайты. Полученную плазмиду называют pCGOBPILT. Схема процедуры клонирования представлена на фиг.5. Для описания различных бинарных плазмид смотри pGA642 или 645; An et al. (1985) EMBO. J. 4 277 - 288 или pCGN1558 или 1559; MacBride and Summerfeldt (1990) Plant. Molec. Biol. 14.269 – 276.

Р. Трансформация pCGOBPILT в *Agrobacterium* штамм EHA101

Отдельную EHA101 колонию (Hood et al., (1986) J. Bact. 168: 1291 - 1301) используют для того, чтобы инокулировать 5мл LB + 100мкг/мл канамицина. Эту культуру выращивают в течение 48 часов при 28°C. 5мл этой культуры используют для инокулирования 500мл LB + 100мкг/мл канамицина. Эту культуру выращивают при 28°C до тех пор, пока, плотность культуры не достигает OD₆₀₀ = 0,5 (приблизительно 4 часа). В результате центрифугирования клетки осаждают (10мин, 5000хg), и снова суспендируют в 500мл стерильной H₂O (повторяют 2 раза). Клетки снова центрифугируют и снова суспендируют в 3мл стерильной H₂O, содержащей 10% глицерина. Аликвоты по 40мкл помещают в ампулы Эппендорфа, и либо непосредственно используют для электропорации, либо хранят при - 80°C до дальнейшего использования. Электропорацию осуществляют по способу Bower et al., Nucl. Acid, Res. (1988) 16 6127 - 6145. Мощность импульсного генератора устанавливают 25мкФ, 2,5кВ и 200ом параллельно с камерой образца.

Г. Трансформация *Nicotiana tabacum* (табак) с помощью pCGOBPILT

Для трансформации дисков листьев табака используют EHA101, содержащий pCGOBPILT. Листья табака длиной 8 - 10см берут с растений, растущих в оранжерее, стерилизуют в 70% этаноле в течение 20 секунд, а затем в 10% хлорной извести (например, Javex) в течение 8 минут. Затем листья 6 раз промывают стерильной водой. Край листьев, а также среднюю жилку иссекают, а остальную часть листовой пластины нарезают на квадраты 5 x 7мм или диски диаметром 5мм. Собирают около 30 листовых дисков и помещают в небольшую чашку Петри. Затем на диски выливают раствор *Agrobacterium* и инкубируют в течение 9 минут. Затем осуществляют блоттинг на стерильной Ватманской фильтровальной бумаге, и помещают плоской стороной вниз на среду I (MS, 3% сахарозы и 2мг/л 2,4-Д). Такое совместное культивирование ведут в течение последующих 48 часов. В этот момент диски листьев переносят на селекционную среду (MD, 3% сахарозы, 2,5мг/л Ba, 0,1мг/л NAA, 500мг/л карбенициллина и 100мг/л канамицина), где и оставляют затем на 3 - 4 недели. После появления проростков их иссекают и помещают на корнеобразующую среду (MS, 3% сахарозы, 0,1мг/л Naa, 500мг/л карбенициллина и 50мг/л канамицина). После образования достаточной корневой системы растения табака переносят в почву.

Н. Трансформация *B. napus* с помощью pCGOBPILT

Трансформация на *B. napus* ведут по способу Moloney et al., (1989) Plant Cell Rep., 8: 238 - 242 (включено сюда по ссылке).

Процедура трансформации

Отдельные колонии *Agrobacterium tumefaciens* штамма EYA101, содержащие бинарную плазмиду, выращивают в течение ночи при 28°C на АВ среде. Образец 50мкл надосадочной жидкости этой среды выращивают в течение ночи при 28°C в 5мл бульона MG/L, дополненного соответствующими антибиотиками. Эту бактериальную суспензию осаждают центрифугированием в течение 15 минут при 10000хg, затем повторно суспендируют в 10мл MS среды, содержащей 3% сахарозы при pH5,8. Тонкую пленку этой суспензии используют для выстилания дна чашки Петри диаметром 5см. Отдельные вырезанные семядоли берут с описанных ранее пластин и срезанную поверхность их петиолей погружают в эту бактериальную суспензию на несколько секунд. Их немедленно возвращают на те же самые MS пластины, с которых их взяли. Семядоли культивируют совместно с *Agrobacterium* в течение 72 часов; при этом не используют питательных слоев.

После совместного культивирования семядоли переносят на регенерационную среду, содержащую MS среду, дополненную 20мкМ бензиладенина, 3% сахарозы, 0,7% фитагара, pH5,8 и 500мг/л карбенициллина (Puoren, Ayerst) и 15мг/л канамицин-сульфата (Boehringer-Mannheim). Снова петиоли осторожно вставляют в агар на глубину 2мм. Плотность растений поддерживают около 10 эксплантатов на пластину. Более высокая плотность снижает регенерируемость.

Отбор и регенерация растений

Эксплантаты выдерживают на регенерационной среде в специфических условиях освещенности и температуры в течение 2 - 3 недель. За это время более чем на половине эксплантатов появляются ростки при относительно небольшом образовании каллуса. Некоторые из этих ростков обесцвечиваются к четвертой неделе культивирования. Оставшиеся зеленые ростки субкультивируют на среде для удлинения корней, которая представляет собой регенерационную среду, но без бензиладенина. Одна-две недели на этой среде обеспечивают установление апикального доминирования из образовавшихся ростковых кластеров. Полученные таким образом ростки переносят на "корнеобразующую" среду, содержащую MS среду, 3% сахарозы, 2мг/л индолмасляной кислоты, 0,7% фитагара и 500мг/л карбенициллина. На этой стадии не используют канамицин, так как было обнаружено, что без селектирующего агента происходит более быстрое корнеобразование, тогда

как очень мало "промахов" реально наблюдается на корнеобразовании после двух раундов отбора на регенерационной и удлиняющей корни среде.

I. Стабильная интеграция OBPILT в геномы табака и *V. parus*

Предположительно трансформированные растения тестируют на активность неомицин-фосфотрансферазы. Выделяют геномную ДНК из растений, демонстрирующих такую активность. Саузерн-блоттинг осуществляют для демонстрации того, что последовательности между Т-ДНК границами (OBPILT и геном неомицин-фосфотрансферазы) стабильно интегрированы в геномы *V. parus* и табака. Саузерн табака зондируют *A. thaliana* олеозиновым геном, а геном неомицин-фосфотрансферазы, *V. parus* Саузерн зондируют геном неомицин-фосфотрансферазы.

Ж. Экспрессия олеозин-IL-I- β слияния в растениях табака РЖ выделяют из развивающихся эмбрионов, полученных из трансформированных и нетрансформированных растений. Нозерн-блоттинг осуществляют, используя *A. thaliana* олеозин в качестве генного зонда. Во всех тестированных трансформированных растениях можно обнаружить 850-нуклеотидный транскрипт. Размеры этих транскриптов соответствуют ожидаемым размерам мРНК олеозин-IL-I- β . Эти транскрипты обнаруживаются в не трансформированных растениях.

К. Накопление олеозин- IL-1-В протеина

Протеины масляных тел выделяют из трансформированных семян табака. (Holbrook et al., (1991) Plant Physical 97: 1051 - 1058. Осуществляют PAGE, и протеин переносят из геля на PVDF мембраны. Для определения слияния олеозин-IL-I- β в семенах табака используют антитела, которые вырабатываются против 22кДа олеозина *V. parus*. Эти антитела распознают все основные олеозины в *V. parus* и *A. thaliana*. Кроме того, эти антитела распознают олеозины табака. Олеозины табака имеют размеры, отличающиеся от олеозинов *A. thaliana* и *V. parus*. В трансформированных семенах табака анти-22кДа антитела распознают 20кДа - протеин, который отсутствует в семенах нетрансформированных растений. Предсказанный размер олеозин-IL-I- β слияния составляет 20,1кДа. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты экспрессии*)

	Стабильная интеграция Саузерн- блоттинг	Экспрессия олеозин- IL-1- β Нозерн- блоттинг	Определение 20 кДа протеина Вестерн-блоттинг
I	2	3	4
В. парус :			
не трансформировано	-	NT	NT
трансформант № 12	+	NT	NT
I	2	3	4
Табак:			
не трансформировано	-	+	+
трансформант А	+	+	+
трансформант В	+	+	+
трансформант G	+	+	+
трансформант L	+	+	+

*) Стабильная интеграция, определенная кар; описано в I.

Экспрессию олеозин-IL-I- β слияния определяют по способу Ж. Детектирование предполагаемого протеина слияния олеозин-IL-I- β ведут по способу К. NT = не тестировали.

За счет экспрессии представляющего интерес пептида, конъюгированного с протеином масляного тела, или его частью, достаточной для обеспечения его направленного транспорта к масляным телам, представляющий интерес пептид можно легко очистить, то есть, практически отделить его от других клеточных компонентов. Протеин слияния можно расщепить после очистки, или его можно использовать далее без расщепления. Рассматриваемые способы и композиции обеспечивают быстрый, простой способ очистки представляющего интерес полипептида.

Все публикации и патентные заявки, указанные в этом описании, включены сюда по ссылке.

Далее настоящее изобретение раскрыто полностью, но специалистам должно быть ясно, что не выходя за рамки объема и сути прилагаемой формулы изобретения можно осуществить множество измерений и модификаций.

Формула винаходу

1. Способ экспрессии рекомбинантного полипептида растительной или бактериальной клеткой-хозяином, отличающийся тем, что указанный способ включает:

а) введение в растительную или бактериальную клетку-хозяина химерной ДНК, включающей первую последовательность ДНК, способную регулировать транскрипцию в указанной клетке-хозяине второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность кодирует рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перевода рекомбинантного слитого полипептида в липидную фазу, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей указанный рекомбинантный полипептид, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область, функциональную в клетке-хозяине, и

б) культивирование указанной клетки-хозяина для получения рекомбинантного слитого полипептида.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно включает отделение рекомбинантного слитого полипептида от компонентов клетки-хозяина путем селективного распределения в липидную фазу.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно включает отделение рекомбинантного слитого полипептида от компонентов клетки-хозяина путем селективного распределения в липидную фазу, содержащую масляные тела.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый полипептид отделяют путем добавления компонентов масляного тела и восстановления масляных тел.

5. Способ по п. 2, отличающийся тем, что дополнительно включает высвобождение рекомбинантного полипептида из рекомбинантного слитого полипептида, связанного с липидной фазой, отличающийся тем, что включает:

с) встраивание в указанную вторую последовательность ДНК между указанной последовательностью ДНК (i), кодирующей белок олеозин, и последовательностью ДНК (ii), кодирующей указанный рекомбинантный полипептид, линкерной последовательности ДНК (iii), кодирующей аминокислотную последовательность, которая может быть специфично расщеплена ферментным или химическим агентом, и

д) контактирование липидной фазы с указанным ферментным или химическим агентом таким образом, что указанный рекомбинантный полипептид высвобождается из рекомбинантного слитого полипептида.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанная аминокислотная последовательность, кодируемая указанной линкерной последовательностью ДНК, может быть расщеплена ферментным агентом.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанная линкерная последовательность ДНК кодирует аминокислотную последовательность, распознаваемую с помощью протеолитического действия фермента, выбранного из группы, состоящей из тромбина, фактора Ха, коллагеназы и химозина.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный ферментный агент содержит иммобилизованный фермент.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный фермент иммобилизован путем связывания белка олеозина, который ассоциирован с масляным телом.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой фермент.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой фермент, который сохраняет свои ферментативные свойства, будучи частью рекомбинантного слитого полипептида, связанного с масляным телом.

12. Способ получения и высвобождения рекомбинантного полипептида из рекомбинантного слитого полипептида, связанного с фракцией масляных тел растений во время прорастания семян и роста проростка растения, отличающийся тем, что включает:

а) введение в растительную клетку первой химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную регулировать транскрипцию в указанной растительной клетке второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность ДНК кодирует рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в масляное тело, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный полипептид, и (iii) линкерную последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность, которая может быть специфично расщеплена ферментным агентом, где указанная линкерная последовательность ДНК (iii) расположена между указанной последовательностью ДНК (i), кодирующей белок олеозин, и указанной последовательностью ДНК (ii), кодирующей рекомбинантный полипептид, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область,

б) последовательное или одновременное введение в геном указанного растения второй химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную во время прорастания семян и роста проростка специфично регулировать транскрипцию второй последовательности ДНК, кодирующей специфичный фермент, который способен расщеплять линкерную последовательность ДНК из указанной первой химерной ДНК, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область,

с) регенерирование растения из указанной растительной клетки и выращивание указанного растения с получением семян, посредством чего экспрессируется и связывается с масляными телами указанный рекомбинантный слитый полипептид, и

д) обеспечение прорастания указанного семени, причем указанный фермент, кодируемый указанной второй химерной ДНК экспрессируется и отщепляет рекомбинантный полипептид от рекомбинантного слитого полипептида, связанного с масляными телами, во время прорастания семян и раннего роста проростка.

13. Способ изготовления пищи на основе модифицированных семян путем получения рекомбинантного полипептида, связанного с фракцией масляных тел семян растения, отличающийся тем, что включает:

а) введение в растительную клетку химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную регулировать транскрипцию в указанной растительной клетке второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность ДНК кодирует рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в масляное тело, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный полипептид, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область,

б) регенерирование растения из указанной растительной клетки и выращивание указанного растения с получением семян, посредством чего экспрессируется и связывается с масляными телами указанный рекомбинантный слитый полипептид, и

с) измельчение указанных семян и изготовление пищи на основе модифицированных семян.

14. Способ получения фермента, связанного с масляным телом, в растительной или бактериальной клетке-хозяине и высвобождения указанного фермента из масляного тела, отличающийся тем, что включает:

а) трансформирование растительной или бактериальной клетки-хозяина химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную регулировать транскрипцию второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность ДНК кодирует рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в масляное тело, (ii) последовательность ДНК, кодирующую фермент, и (iii) линкерную последовательность ДНК, расположенную между указанной последовательностью ДНК (i), кодирующей белок олеозин, и указанной последовательностью ДНК (ii), кодирующей фермент, где указанная последовательность ДНК (iii) кодирует аминокислотную последовательность, которая может быть расщеплена ферментом, кодируемым последовательностью ДНК (ii), и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область, функциональную в указанной клетке-хозяине,

б) культивирование клетки-хозяина с получением рекомбинантного слитого полипептида в условиях, при которых фермент неактивен,

с) выделение масляных тел, содержащих рекомбинантный слитый полипептид, и

д) изменение условий среды, окружающей масляные тела, таким образом, что фермент активируется и отщепляется от рекомбинантного слитого полипептида.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанный фермент активируется путем понижения значения pH среды, окружающей масляные тела.

16. Способ экспрессии рекомбинантного полипептида, связанного с масляным телом, растительной или бактериальной клеткой-хозяином и выделения указанного рекомбинантного полипептида из масляного тела, отличающийся тем, что включает:

а) трансформирование первой растительной или бактериальной клетки-хозяина первой химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную регулировать транскрипцию в указанной клетке-хозяине второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность кодирует первый рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в липидную фазу, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей указанный рекомбинантный полипептид, и (iii) линкерную последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность, которая может быть специфично расщеплена ферментным агентом, где указанная линкерная последовательность ДНК (iii) расположена между указанной последовательностью ДНК (i), кодирующей белок олеозин, и указанной последовательностью ДНК (ii), кодирующей рекомбинантный полипептид, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область, функциональную в указанной клетке-хозяине,

б) трансформирование второй растительной или бактериальной клетки-хозяина второй химерной ДНК, содержащей первую последовательность ДНК, способную во время прорастания семян и роста проростка специфично регулировать транскрипцию второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность кодирует второй рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в липидную фазу, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей специфичный фермент, который способен расщеплять линкерную последовательность ДНК указанной первой химерной ДНК, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область,

с) культивирование указанной первой клетки-хозяина в условиях, при которых первый рекомбинантный слитый полипептид экспрессируется и связывается с масляными телами с получением первой фракции масляных тел, содержащих первый рекомбинантный слитый полипептид,

д) культивирование указанной второй клетки-хозяина в условиях, при которых второй рекомбинантный слитый полипептид экспрессируется и связывается с масляными телами с получением второй фракции масляных тел, содержащих второй рекомбинантный слитый полипептид,

е) взаимодействие первой фракции масляных тел со стадии (с) со второй фракцией масляных тел со стадии (d) в таких условиях, что ферментная часть второго рекомбинантного слитого полипептида отщепляет первый рекомбинантный полипептид от первого рекомбинантного слитого полипептида.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой интерлейкин.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой ингибитор тромбина.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный полипептид представляет собой гирудин.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой растительную клетку.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанное растение является двудольным.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанное растение относится к семейству Brassicaceae.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в указанной второй последовательности ДНК последовательность ДНК (i) представляет собой ген олеозина, полученный из растения семейства Brassicaceae.

25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в указанной второй последовательности ДНК последовательность ДНК (i) представляет собой ген олеозина, полученный из *Arabidopsis thaliana*.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанная первая последовательность ДНК получена из гена олеозина из растения *Arabidopsis thaliana*.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанная ДНК (I) имеет следующую последовательность SEQ ID NO 1:

```
CCATGGCTAT ACCCAACCTC GGTCTTGGTC ACACCAGGAA CTCTCTGGTA AGCTAGCTCC 60
ACTCCCCAGA AACCAACCGC GCCAAATTGC CGGAATTGCT GACCTGAAGA CGGAACATCA 120
TCGTCGGGTC CTTGGGCGAT TCGGCGGAA GATGGGTCAG CTTGGGCTTG AGGACGAGAC 180
CCGAATCGAG TCTGTTGAAA GGTGTTTCAT TGGGATTTGT ATACGGAGAT TGGTCGTCGA 240
GAGGTTTGAG GGAAGGACA AATGGGTTTG GCTCTGGAGA AAGAGAGTGC GGCTTTAGAG 300
AGAGAATTGA GAGGTTTAGA GAGAGATGCG GCGGCGATGA CGGAGGAGA GACGACGAGG 360
ACCTGCATTA TCAAAGCAGT GACGTGGTGA AATTTGGAAC TTTTAAGAGG CAGATAGATT 420
TATTATTTGT ATCCATTTTC TTCATTGTTT TAGAATGTCG CGGAACAAAT TTTAAACTA 480
AATCCTAAAT TTTTCTAATT TTGTTGCCAA TAGTGGATAT GTGGGCCGTA TAGAAGGAAT 540
CTATTGAAGG CCCAAACCCA TACTGACGAG CCCAAAGGTT CGTTTTGCGT TTTATGTTTC 600
GGTTCGATGC CAACGCCACA TTCTGAGCTA GGCAAAAAAC AAACGTGTCT TTGAATAGAC 660
TCCTCTCGTT AACACATGCA GCGGCTGCAT GGTGACGCCA TTAACACGTG GCCTACAATT 720
GCATGATGTC TCCATTGACA CGTGACTTCT CGTCTCCTTT CTTAATATAT CTAACAAACA 780
CTCCTACCTC TTCCAAAATA TATACACATC TTTTGTGATCA ATCTCTCATT CAAAATCTCA 840
TTCTCTCTAG TAAACAAGAA CAAAAAATG GCGGATACAG CTAGAGGAAC CCATCACGAT 900
ATCATCGGCA GAGACCAGTA CCCGATGATG GGCCGAGACC GAGACCAGTA CCAGATGTCC 960
GGACGAGGAT CTGACTACTC CAAGTCTAGG CAGATTGCTA AAGCTGCAAC TGCTGTCACA 1020
GCTGGTGGTT CCCTCCTTGT TCTCTCCAGC CTTACCCCTG TTGGAACGTG CATAGCTTTG 1080
ACTGTTGCAA CACCTCTGCT CGTTATCTTC AGCCCAATCC TTGTCCCGGC TCTCATCACA 1140
GTTGCACTCC TCATCACCGG TTTTCTTTCC TCTGGAGGGT TTGGCATTGC CGCTATAACC 1200
GTTTCTCTTT GGATTTACAA GTAAGCACAC ATTTATCATC TTAATTCATA ATTTTGTGCA 1260
ATATGTGCAT GCATGTGTTG AGCCAGTAGC TTTGGATCAA TTTTGTGGT CGAATAACAA 1320
ATGTAACAAT AAGAAATTGC AAATTCTAGG GAACATTTGG TTAACATAAT ACGAAATTTG 1380
ACCTAGCTAG CTTGAATGTG TCTGTGTATA TCATCTATAT AGGTAAAAATG CTTGGTATGA 1440
TACCTATTGA TTGTGAATAG GTACGCAACG GGAGAGCACC CACAGGGATC AGACAAGTTG 1500
GACAGTGCAA GGATGAAGTT GGGAAGCAA GCTCAGGATC TGAAAGACAG AGCTCAGTAC 1560
TACGGACAGC AACATACTGG TGGGGAACAT GACCGTGACC GTACTCGTGG TGGCCAGCAC 1620
ACTACTTAAG TTACCCCACT GATGTCATCG TCATAGTCCA ATAACCTCAA TGTCGGGGAG 1680
TTAGTTTATG AGGAATAAAG TGTTTAGAAT TTGATCAGGG GGAGATAATA AAAGCCGAGT 1740
TTGAATCTTT TTGTTATAAG TAATGTTTAT GTGTGTTTCT ATATGTTGTC AAATGGTACC 1800.
```

Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанная последовательность ДНК (i) кодирует полипептид, имеющий следующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 5:

Met Met Gly Arg Asp Arg Asp Gln Tyr Gln Met Ser Gly Arg Gly Ser 29.
1 5 10 15
5 Asp Tyr Ser Lys Ser Arg Gln Ile Ala Lys Ala Ala Thr Ala Val Thr
20 25 30
Ala Gly Gly Ser Leu Leu Val Leu Leu Ser Leu Thr Leu Val Gly Thr
35 40 45
Val Ile Ala Leu Thr Val Ala Thr Pro Leu Leu Val Ile Phe Ser Pro
10 50 55 60
Ile Leu Val Pro Ala Leu Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Thr Gly Phe
65 70 75 80
Leu Ser Ser Gly Gly Phe Gly Ile Ala Ala Ile Thr Val Phe Ser Trp
85 90 95
15 Ile Tyr Lys Tyr Leu Leu Ile Glu His Pro Gln Gly Ser Asp Lys Leu
100 105 110
Asp Ser Ala Arg Met Lys Leu Gly Ser Lys Ala Gln Asp Leu Lys Asp
115 120 125
20 Arg Ala Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln His Thr Gly Gly Glu His Asp Arg
130 135 140
Asp Arg Thr Arg Gly Gly Gln His Thr Thr
145 150.

25 Химерная ДНК, способная экспрессироваться в связи с масляным телом растительной или бактериальной клетки-хозяина, содержащая первую последовательность ДНК, способную регулировать в указанной растительной или бактериальной клетке-хозяине транскрипцию второй последовательности ДНК, где указанная вторая последовательность ДНК кодирует рекомбинантный слитый полипептид и содержит (i) последовательность ДНК, кодирующую часть белка олеозина, достаточную для обеспечения перехода рекомбинантного слитого полипептида в липидную фазу, соединенную в рамке считывания с (ii) последовательностью ДНК, кодирующей указанный рекомбинантный полипептид, и третью последовательность ДНК, кодирующую терминирующую область, функциональную в указанной клетке-хозяине.

30. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (ii) кодирует фермент.

35 31. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что дополнительно включает (iii) линкерную последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность, которая может быть специфично расщеплена ферментным агентом, где указанная линкерная последовательность ДНК (iii) расположена между указанной последовательностью ДНК (i), кодирующей белок олеозин, и указанной последовательностью ДНК (ii), кодирующей рекомбинантный полипептид.

40 32. Химерная ДНК по п. 31, отличающаяся тем, что указанная линкерная последовательность ДНК (iii) кодирует сайт расщепления ферментом, выбранным из группы, состоящей из тромбина, фактора Ха, коллагеназы и химозина.

33. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (ii) кодирует интерлейкин.

45 34. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (ii) кодирует ингибитор тромбина.

35. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (ii) кодирует гирудин.

36. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (i) представляет собой ген олеозина, полученный из растения семейства Brassicaceae.

50 37. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (i) представляет собой ген олеозина, полученный из *Arabidopsis thaliana*.

38. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная первая последовательность ДНК получена из гена олеозина из растения *Arabidopsis thaliana*.

39. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (i) представлена в SEQ ID NO 1.

55 40. Химерная ДНК по п. 29, отличающаяся тем, что указанная последовательность ДНК (i) кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность представленную в SEQ ID NO 5.

41. Экспрессирующая кассета, содержащая химерную ДНК, охарактеризованную в п. 29.

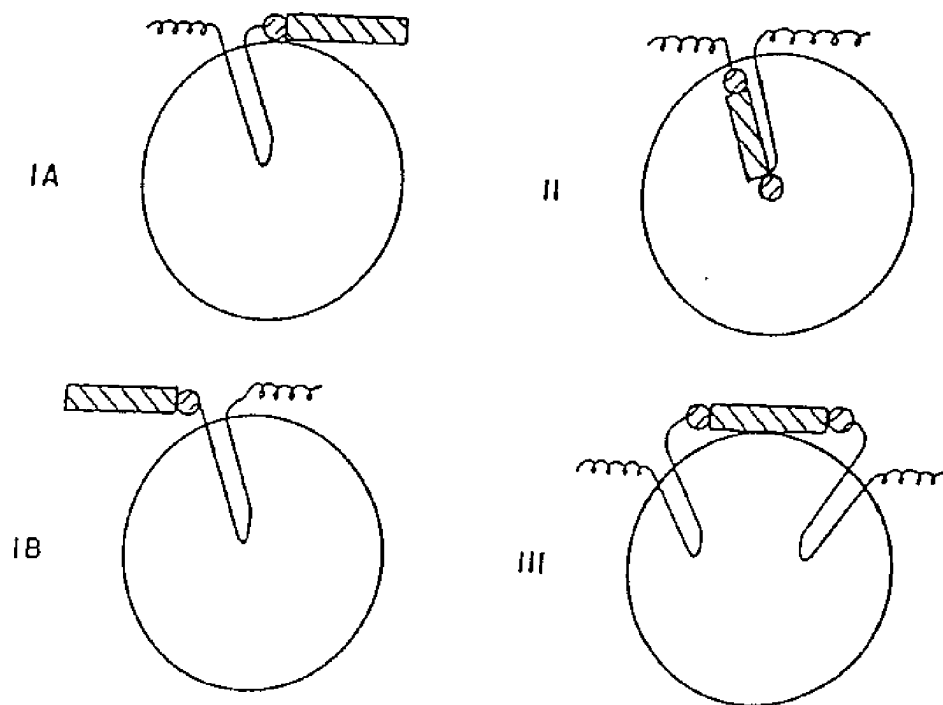
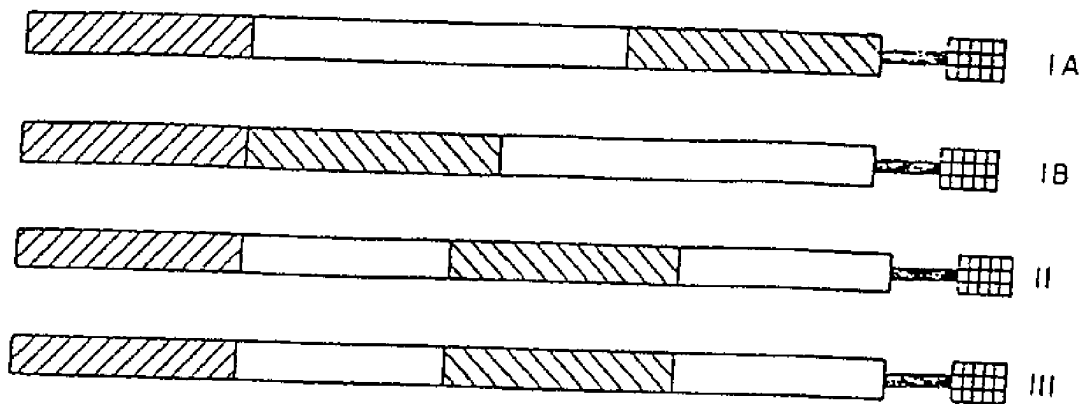
60 42. Способ получения трансгенного растения, который предусматривает регенерацию указанного растения из культуры растительных клеток, трансформированных химерной последовательностью ДНК, охарактеризованной в п. 29.

43. Культура растительных клеток, содержащих химерную ДНК, охарактеризованную в п. 29.

U A 4 6 6 8 9 C 2

U. 46689 C2





Фиг. 2

Xho I

....AGC ACT GCT CGA GAC ACT TCA AGG ACT....Моркови OBP
 Ser Thr Ala Arg Asp Thr Ser Arg Thr.... (См. Hatzopoulos
 и др. 1990)

3'..AGC ACT GC Xho I TCGA CCG CTC GGT CCG GC Nco I
 TCG TGA CGAGCT GGC GAG CCA GGC CCGTAC

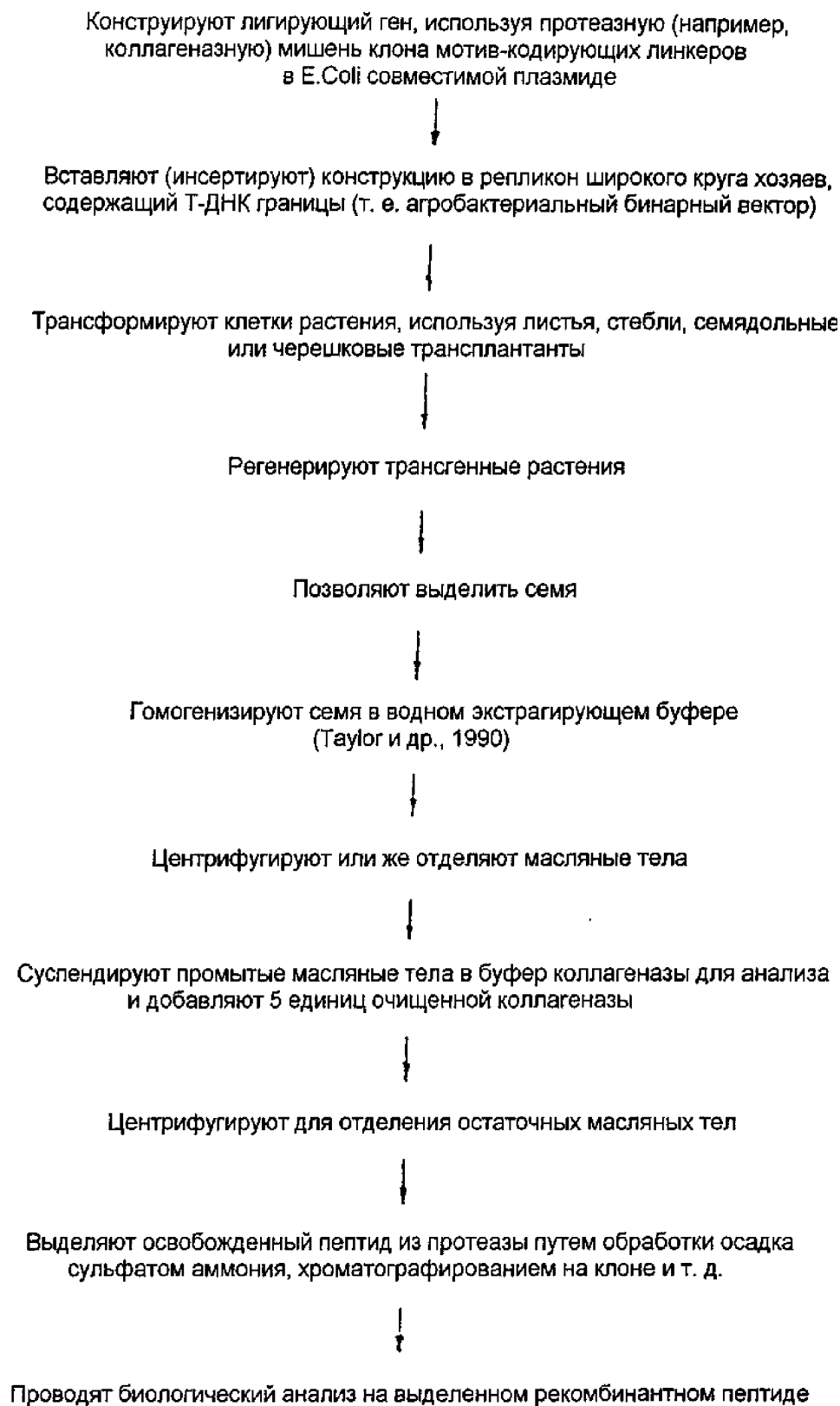
Pro Leu Gly Pro

Коллагеназа узнающий мотив

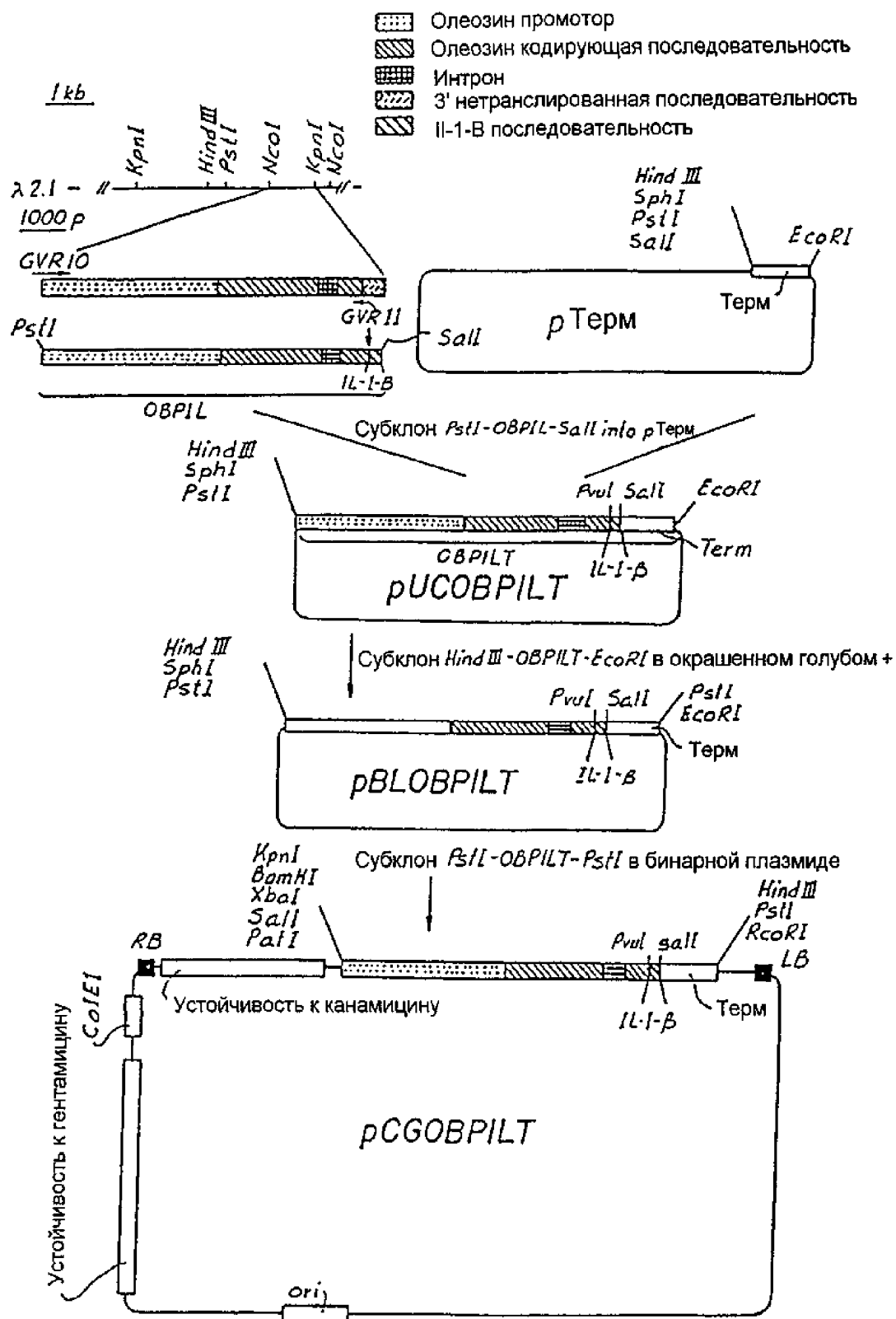
Фиг. 3

U A 4 6 6 8 9 C 2

U A 4 6 6 8 9 C 2



Фиг. 4



Фиг. 5

Интерлейкин 1- β gvr11 (71-мер)

- a) A. thaliana oleosin Factor Xa
 А. талиан олеозин Фактор Ха
 gly gly gln his thr thr ala ile glu gly arg val gln
 gly glu glu ser asn asp lys OCH val asp
 GGT GGC CAG CAC ACT ACT GCT ATC GAA GGG AGA GTT CAG
 PvuI
 GGA GAA GAA TCT AAC GAC AAG TAA GTC GAC GG
 Sall
- b) 3'CCA CCG GTC GTG TGA TGA CGC TAG CTT CCC TCT CAA GT
 [.....]
 CCT CTT CTT AGA TTG CTG TTC ATT CAG CTG CC 5'
]

Фиг. 6

U A 4 6 6 8 9 C 2

U A 4 6 6 8 9 C 2

PstI
 CACTGCAGGAAGCTCTCTGGTAAGCTAGCTCCACTCCCCAGAAACAACCGGCGCCAAATTGCC
 GGAATTGCT
 GACCTGAAGACGGAACATCATCGTCGGGTCCTTGGGCGATTGCGGCGGAAGATGGGTCAGCT
 TGGGCTTGAG
 GACGAGACCCGAATCGAGTCTGTTGAAAGGTTGTTTCATTGGGATTGTATACGGAGATTGGTC
 GTCGAGAGG
 TTTGAGGGAAGGACAAATGGGTTTGGCTCTGGAGAAAGAGAGTGCGGCTTTAGAGAGAGAA
 TTGAGAGGTT
 TAGAGAGAGATGCGGCGGCGATGACGGGAGGAGAGACGACGAGGACCTGCATTATCAAAGCA
 GTGACGTGGT
 GAAATTTGGAACTTTTAAGAGGCAGATAGATTTATTATTTGTATCCATTTTCTTCATTGTTT
 TAGAATGTCG
 CGGAACAAATTTTAACTAAATCCTAAATTTTTCTAATTTTGTTGCCAATAGTGGATATGT
 GGGCCGTATA
 GAAGGAATCTATTGAAGGCCCAAACCCATACTGACGAGCCCAAAGGTTTCGTTTTGCGTTTTA
 TGTTTCGGTT
 CGATGCCAACGCCACATTCTGAGCTAGGCCAAAAACAAACGTGTCTTTGAATAGACTCCTCT
 CGTTAACACA
 TGCAGCGGCTGCATGGTGACGCCATTAACACGTGGCCTACAATTGCATGATGTCTCCATTGA
 CACGTGACTT
 CTCGTCTCCTTTCTTAATATATCTAACAAACACTCCTACCTCTTCCAAAATATATACACATC
 TTTTGTATCA
 ATCTCTCATTCAAATCTCATTCTCTCTAGTAAACAAGAACAACAAATGGCGGATACAGCT
 AGAGGAACCC
 ATCAGGATATCATCGGCAGAGACCAGTACCCGATGATGGGCGGAGACCGAGACCAGTACCAG
 ATGTCCGGAC
 GAGGATCTGACTACTCCAAGTCTAGGCAGATTGCTAAAGCTGCAACTGCTGTACAGCTGGT
 GGTTCCCTCC
 TTGTTCTCTCCAGCCTTACCCTTGTTGGAAGTGTATAGCTTTGACTGTTGCAACACCTCTG
 CTCGTTATCT
 TCAGCCCAATCCTTGTCCTCGGCTCTCATCACAGTTGCACTCCTCATCACCGGTTTTCTTTCC
 TCTGGAGGGT
 TTGGCATTGCCGCTATAACCGTTTTCTCTTGGATTACAAAGTAAGCACACATTTATCATCTT
 ACTTCATAAT
 TTTGTGCAATATGTGCATGCATGTGTTGAGCCAGTAGCTTTGGATCAATTTTTTTGGTCGAA
 TAACAAATGT
 AACAAATAAGAAATTGCAAAATCTAGGGAACATTTGGTTAACTAAATACGAAATTTGACCTAG
 CTAGCTTGAA
 TGTGTCTGTGTATATCATCTATATAGGTAATAATGCTTGGTATGATACCTATTGATTGTGAAT
 AGGTACGCAA
 CGGGAGAGCACCCACAGGGATCAGACAAGTTGGACAGTGCAAGGATGAAGTTGGGAAGCAAA
 GCTCAGGATC
 TGAAAGACAGAGCTCAGTACTACGGACAGCAACATACTGGTTGGGAACATGACCGTGACCGT
 ACTCGTGGTG
 GCCAGCACACTACTGCGATCGAAGGGAGAGTTCAGGGAGAAGAATCTAACGACAAGTAAGTC
 GACTCTAG
 ACGGATCTCCCgatacggttcaaacattttggcaataaagtttcttaagattgaatcctggtgca
 ggtcttgaga
 tgattatcatataattttctggtgaattacggttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatg
 acgttattta
 tgagatggggtttttatgattagagtcccgcgaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaa
 atatagecgcg
 caaactaggataaattatcgcgcgcggtgtcatctatggttactagatcGGAATTC

EcoRI

Фиг. 7

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.