



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **51 642** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/54, 9/10**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97084350, 10.01.1996

(24) Дата начала действия патента: 16.12.2002

(30) Приоритет: 23.01.1995 DE 19501840.0

(46) Дата публикации: 15.12.2002

(86) Заявка РСТ:
РСТ/ЕР96/00068, 19960110

(72) Изобретатель:

Бизелер Барбара, DE,

Райнемер Петер, DE,

Хайн Рюдигер, DE,

Манн Карльхайнц, DE,

Райф Ханс-Йорг, DE,

Томцик Юрген, DE

(73) Патентовладелец:

БАЙЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ, DE

(54) ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОТОРАЯ КОДИРУЕТ БЕЛОК ГЛУТАТИОН
-S-ТРАНСФЕРАЗУ, БЕЛОК

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к новой дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), которая кодирует глутатион-3-трансферазу.

Официальный бюллетень "Промышленная

собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 12, 15.12.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2



(19) **UA** (11) **51 642** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 15/54, 9/10**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

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

(21), (22) Application: 97084350, 10.01.1996

(24) Effective date for property rights: 16.12.2002

(30) Priority: 23.01.1995 DE 19501840.0

(46) Publication date: 15.12.2002

(86) PCT application:
PCT/EP96/00068, 19960110

(72) Inventor:

Brizeler Barbara, DE,
Rainemer Peter, DE,
Khain Riudiger, DE,
Mann Karlhaints, DE,
Raif Hans-Jorg, DE,
Tomtsik Jurgen, DE

(73) Proprietor:

BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT, DE

(54) **DESOXYRIBONUCLEIC ACID CODING THE PROTEIN GLUTATION-S-TRANSFERASE, PROTEIN**

(57) Abstract:

The present invention relates to a novel desoxyribonucleic acid (DNA).

Official bulletin "Industrial property". Book

1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 12, 15.12.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2



(19) **UA** (11) **51 642** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 15/54, 9/10**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97084350, 10.01.1996

(24) Дата набуття чинності: 16.12.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 23.01.1995 DE 19501840.0

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.12.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
РСТ/ЕР96/00068, 19960110

(72) Винахідник(и):

Бізелер Барбара , DE,
Райнемер Петер , DE,
Хайн Рюдігер , DE,
Манн Карльхайнц , DE,
Райф Ханс-Йорг , DE,
Томцік Юрген , DE

(73) Власник(и):

БАЙЕР АКЦІОНГЕЗЕЛЬШАФТ, DE

(54) ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕІНОВА КИСЛОТА, ЯКА КОДУЄ БІЛОК ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗУ, БІЛОК

(57) Реферат:

Даний винахід стосується нової

дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), що кодує глютаціон-3-трансферазу.

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к новой дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), которую можно применять для трансформации векторов, организмов-хозяев и растений, а также для выведения растений с повышенной устойчивостью к гербицидам, и к белку с соответствующей аминокислотной последовательностью.

Широко известно, что растения можно генетически так изменять, что они начинают проявлять повышенную устойчивость к определенным гербицидам. Это дает возможность использовать гербициды, которые при незначительной селективности в остальном обнаруживают полезные свойства, в культурах таких растений, которые в первоначальной нетрансгенной форме повреждались этими гербицидами. Путем выращивания устойчивых к гербицидам растений возрастает выбор применяемых гербицидов, и во многих случаях можно также обойтись относительно малыми количествами гербицидов, например, когда борьба с нежелательными растениями может начаться только после их усиленного роста при достижении в каждом случае порога вредности. При этом существует значительная потребность выведения новых культурных растений, проявляющих повышенную устойчивость в отношении других гербицидов.

Глутатион-S-трансферазы являются многофункциональными белками, которые играют важную роль при обезвреживании цитотоксических соединений. Эти ферменты катализируют конъюгацию восстановленного глутатиона с электрофильными гидрофобными субстратами, которые могут быть природного или синтетического происхождения.

Физиологические субстраты глутатион-S-трансфераз растений и их роль в обмене веществ растений, в частности, неизвестны. Однако, доказано участие этих ферментов в обезвреживании и, таким образом, в механизме селективности для ряда важных гербицидов из группы тиокарбаматов, хлорацетанилида и S-триацина: Mozer T.J., Tiemeier D.C., Jaworski E.G., *Biochemistry* 22 : 1068-1072 (1983); Moore R.E., Davies M.S., O'Connell K.M., Harding E.I., Wiegand R.C., Tiemeier D.C., *Nucleic Acids Res.* 14 : 7227-7235 (1983); Grove G., Zarlengo R.P., Timmermann K.P., Li N., Tarn M.F., Tuc C.P.D., *Nucleic Acids Res.* 16:425-438 (1988).

Согласно изобретению предлагается новая дезоксирибонуклеиновая кислота, кодирующая новый белок глутатион-S-трансферазу IIIc (в дальнейшем "GSTIIIc"), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID № 2, (при этом новая ДНК согласно изобретению в дальнейшем обозначается "GSTIIIc-ДНК").

Было найдено, что растения, в геном которых была вставлена новая GSTIIIc-ДНК, обладают по сравнению с соответствующими исходными растениями повышенной устойчивостью в отношении гербицидов, преимущественно в отношении гетероарилоксиацетамидных гербицидов.

Новая GSTIIIc-ДНК была выделена из кукурузы (*Zea mays*) сорта Mutin. Эта ДНК кодирует белок GSTIIIc с аминокислотной последовательностью SEQ ID № 2. В клетках растений две молекулы белка GSTIIIc спонтанно образуют димерный активный фермент (в дальнейшем обозначается как "GSTIIIc-фермент"), который способствует обезвреживанию добавленного гербицида, при этом растения становятся устойчивыми по отношению к гербициду.

Предпочтительная GSTIIIc-ДНК согласно изобретению имеет последовательность SEQ ID № 1.

Также предпочтительна согласно изобретению GSTIIIc-ДНК, которая имеется в описанных ниже векторных плаزمиде рETIIIc-GSTIIIc и рSS-GSTIIIc.

Новая GSTIIIc-ДНК может быть одноцепочечной или двуцепочечной, которая дополнительно содержит комплементарную к каждой отдельной цепи нить.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения GSTIIIc-ДНК на 5' конце предварительно присоединяют действующий в растениях промотор. Для этого могут быть использованы обычные эффективные промоторы растений. Например, следует упомянуть промотор гена малой субъединицы рибулоза-1,5-дифосфат-карбоксилазы (rbsc) (см. *EMBO Journal*, том 5, № 9, 2063-2071 (1986)). Предпочтительно вставляются промоторы вирусов растений, при этом следует назвать в качестве примера РНК промотора CaMV 35S. Особенно предпочтительно используется известный конструктор из энхансера CaMV 35S и присоединенного к нему в порядке 5' - 3' промотора CaMV 35S ("двойной промотор CaMV 35S"). Соответствующий предпочтительный конструктор из GSTIIIc-ДНК и двойного промотора CaMV имеется в рассматриваемой ниже векторной плазмиде рSS-GSTIIIc. Однако, также возможно использовать природный промотор, регулирующий экспрессию в GSTIIIc-ДНК в кукурузе сорта Mutin.

Способ, которым с GSTIIIc-ДНК в порядке 5' - 3' соединяется 3'-концевая последовательность, может быть любым и не имеет решающего значения для настоящего изобретения. Предпочтительно вставляют 3'-концевые последовательности растений. Например, может быть также использована природная концевая последовательность GSTIIIc-гена из кукурузы сорта Mutin.

Дополнительным объектом настоящего изобретения является новый белок GSTIIIc с аминокислотной последовательностью SEQ ID № 2, а также его новый димер (GSTIIIc-фермент), который, как было указано выше, спонтанно образуется из 2 молекул белка GSTIIIc после его образования в клетках растений.

GSTIIIc-ДНК согласно изобретению может иметься в качестве "чужеродной" или "дополнительной" ДНК в векторах (в частности, плаزمиде, космиде или фагах), в трансформированных или трансгенных микроорганизмах (преимущественно в бактериях, например, *Escherichia coli* или агробактерия *tumefaciens*), а также в трансформированных или трансгенных клетках растений и растениях или их ДНК. Эти векторы, микроорганизмы, клетки растений и растения, а также их ДНК могут быть получены специалистами в данной области при использовании имеющегося описания, в частности, последовательностей SEQ ID № 1 и SEQ ID № 2, в соответствии с общеизвестными и/или обычными способами и методами.

В связи с настоящим изобретением под "чужеродной" ДНК следует понимать такую ДНК, которая обычно не содержится в определенном геноме прокариот и эукариот (включая растения), но при действии человека (трансформация) соединяется с этим геномом. "Дополнительной" ДНК является такая ДНК, которая почти всегда имеется в соответствующем геноме прокариот или эукариот, однако, в дополнительном количестве воспринимается этим геномом в результате воздействия человека (трансформация). "Чужеродная" или "дополнительная" ДНК может быть встроена в одном или нескольких экземплярах в соответствии с потребностью и видом представленного случая.

В качестве особенно предпочтительных векторов можно назвать векторные плазмиды pET3a-GSTIIIc и pSS-GSTIIIc. Оба вектора содержат GSTIIIc-ДНК по изобретению в соответствии с последовательностью SEQ ID № 1.

Плазмида pET3a-GSTIIIc содержит GSTIIIc-ДНК в фрагменте NdeI/BamHI. Для построения этой плазмиды клонировали GSTIIIc-ДНК в соответствии с последовательностью SEQ ID № 1 в полученных при расщеплении с помощью NdeI и BamHI положениях вектора pET3a (Novagen/Madison) (Studier F.W., Moffatt B.A., J.Mol.Biol. 189:113-130; Studier F.W., J. Mol. Biol. 219: 37-44(1991)). Эта плазмида (5306 П.н.) представлена на фиг.1. Направление стрелок указывает направление промотора и гена или GSTIIIc-ДНК с стартовым кодоном ATG. "Amp" означает ген с устойчивостью к ампициллину.

Для конструирования плазмиды pSS-GSTIIIc выделяли в чистом виде GSTIIIc-ДНК в виде фрагмента XbaI/BamHI из вектора pET3a-GSTIIIc и клонировали в плазмиде Bluescript-SKII (линеаризированной XbaI/BamHI; Stratagene). Затем GSTIIIc-ДНК при рестрикционном расщеплении с участием SstI/SmaI была выделена из полученной таким образом плазмиды Bluescript-SKII-GSTIIIc и лигирована в вектор pRT101 (линеаризированный SstI/SmaI; Topfer и др. 1987). Затем GSTIIIc-ДНК в виде фрагмента EcoRI/SmaI была выделена в чистом виде из полученного таким образом вектора pRT101-GSTIIIc и клонирована в бинарном векторе pSS (линеаризированном EcoRI/SmaI; VoB и др. 1994). В возникшем векторе pSS-GSTIIIc кодирующая GSTIIIc-ДНК находится под контролем РНК двойного промотора CaMV 35S. Плазмида pSS-GSTIIIc (10000 П.н.) представлена на фиг.2.

GSTIIIc-ДНК согласно изобретению может быть при необходимости выделена специалистами из названных плазмид в соответствии с общепринятыми способами и методами.

В качестве особенно предпочтительных микроорганизмов, в которые включают предлагаемую ДНК, следует назвать выделенные из *Escherichia coli* штаммы pET3a-GSTIIIc и pSS-GSTIIIc. Штамм pET3a-GSTIIIc содержит плазмиду pET3a-GSTIIIc, а штамм pSS-GSTIIIc содержит плазмиду pSS-GSTIIIc. Эти штаммы могут быть размножены общепринятыми способами. Плазмиды pET3a-GSTIIIc и pSS-GSTIIIc могут быть также выделены из этих микроорганизмов в соответствии с общепринятыми способами.

Штамм *Escherichia coli* pET3a-GSTIIIc был депонирован в Германской Коллекции Микроорганизмов (DSM), Машеродер Вег 16,0-38124 Брауншвейг, Федеративная Республика Германия, по соглашению в соответствии с постановлением Будапештского Договора о международном признании хранения микроорганизмов для целей патентования (дата депонирования: 17.01.1995). Штамм депонирован под номером DSM 9677.

Как уже указывалось выше, предлагаемую ДНК можно также использовать для создания новых растений, проявляющих повышенную устойчивость по отношению к гербицидам, преимущественно по отношению к гетероарилоксиацетамидным гербицидам. Культуры этих трансгенных растений могут быть обработаны гербицидами для борьбы с нежелательными растениями без нанесения вреда культурным растениям.

Трансгенные клетки растений (включая протопласты) и растения (включая части растений и семена) с повышенной устойчивостью по отношению к гербицидам можно получать тем, что

(а) один или несколько экземпляров GSTIIIc-ДНК и/ или рекомбинантной ДНК согласно изобретению, содержащих GSTIIIc-ДНК, которые кодируют белок GSTIIIc, вставляют в геном клеток растений (включая протопласты) и при необходимости

(б) из трансформированных клеток растений (включая протопласты) регенерируют полностью трансформированные растения, и при необходимости размножают, и при необходимости

(в) из полученных таким образом трансгенных растений родительского поколения или из дальнейших выведенных из них поколений выращивают желаемые части растений (включая семена).

Стадии (а), (б) и (в) могут быть проведены известными способами и методами с использованием обычных приемов.

Существует целый ряд различных способов для встраивания GSTIIIc-ДНК, при желании в виде конструкции с двойным промотором CaMV 35S в виде "чужеродной" или "дополнительной" ДНК в генетический материал растений или клеток растений. Перенос гена может быть осуществлен общеизвестными способами, при этом специалист без труда может найти подходящий способ.

Плазмида *Ti Agrobacterium tumefaciens* является особенно удобным и часто вставляемым вектором для осуществления переноса "чужеродной" или "дополнительной" ДНК в геном двудольных или однодольных растений. Генетический материал, кодирующий белок GSTIIIc, вставляется при необходимости вместе с регуляторными последовательностями ДНК в Т-ДНК подходящих *Ti*-плазмид (например, Zambrysk: и др., 1983) и переносится путем заражения растения, заражения частей растений или тканей растений, как, например, пластинки листьев, стебли, подсемядольные колена, семядоли, меристемы и происходящие из них ткани, как, например, вторичные эмбрионы и каллюсы, или с помощью сокультивирования протопластов *Agrobacterium tumefaciens*. Альтернативой является инкубирование очищенной ДНК, содержащей желаемый ген или желаемую ДНК, в протопластах растений (например, Hain и др., 1985; Krens и др., 1982; Paszkowski и др., 1984) в присутствии поликатионов или солей кальция и полиэтиленгликоля.

Включению ДНК может также дополнительно благоприятствовать электрическое поле (электропорация) (например, Fromm и др., 1986).

Известным способом ДНК может быть также введена через луковицы растений, когда луковицы или другие части растений, которые переносят ДНК, "бомбардируют" (физически ускоряемыми частицами (см. заявку EP № 0 270 356)

Регенерацию растений удается осуществить известным способом с помощью подходящих питательных сред (например, Nagy и Maliga 1976).

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению клонируют GSTIIIc-ДНК из плазмиды pET3a-GSTIIIc в бинарном экспрессирующем векторе (например, YOB и др. (1994)). Химерная генная конструкция затем переносится в агробактерию tumefaciens (Koncz и Schell, 1986).

Альтернативно химерная генная конструкция переносится обычным способом в вектор pSS-GSTIIIc путем прямого генного переноса в протопласты растений (например, Hain и др., 1985). При этом плаزمида может существовать в кругообразной форме, однако, предпочтительно в линейной форме.

При использовании этой плазмиды с репортерным геном были затем проверены на экспрессию GSTIIIc устойчивые к канамицину протопласты.

Трансформированные (трансгенные) растения или клетки растений получают известными способами, например, путем трансформации пластинок листьев (например, Horsch и др., 1985), с помощью сокультивирования регенерирующих протопластов растений или клеточных культур с агробактерией tumefaciens (например, Marton и др., 1979, Hain и др., 1985) или путем прямой трансфекции ДНК. Подтверждение и доказательство получающихся трансформированных растений осуществляется либо путем селекции для экспрессии репортерного гена, например, путем фосфорилирования канамицинсульфата *in vitro* (Reiss и др., 1984; Schreiner и др., 1985), либо путем экспрессии нопалинсинтазы (по Aerts и др., 1983), либо с GSTIIIc путем анализа с применением Нозерн-блоттинга и Вестерн-блоттинга. Белок GSTIIIc может также быть обнаружен в трансформированных растениях известным способом при анализе Вестерн-блот-тингом с помощью специфических антител.

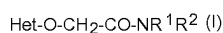
Культивирование трансформированных клеток растений, как и регенерация в полные растения, удается с помощью общеизвестных способов, в каждом случае с использованием подходящих питательных сред.

Как трансформированные клетки растений, так и трансформированные растения, содержащие GSTIIIc-ДНК согласно изобретению, проявляют значительно более высокую устойчивость по отношению к гербицидам, в частности, по отношению к гетероарилоксиацетамидным гербицидам.

В связи с настоящим изобретением выражение "растения" означает как полные растения, так и части растений, такие, как листья, семена, клубни, черенки и так далее. "Клетки растений" включают протопласты, линии клеток, каллюсы растений и так далее. "Материал для размножения" означает растения и клетки растений, которые могут быть использованы для размножения трансформированных растений и клеток растений.

К растениям, которые при встраивании (трансформации) GSTIIIc-ДНК согласно изобретению могут приобрести повышенную устойчивость по отношению к гербицидам, относятся практически все растения. Особую потребность в приобретении устойчивости естественно испытывают культурные растения, такие, как лесные растения, например, пихта, ель, лжесуга, сосна, лиственница, бук и дуб, а также растения, поставляющие пищевые средства и сырье, например, зерновые (в частности, пшеница, рожь, ячмень, овес, просо, рис и кукуруза), картофель, бобовые (как стручковые плоды и, в частности, люцерна, соевые бобы), овощи (в частности, различные сорта капусты и томаты), фрукты (в частности, яблоки, груши, вишня, виноград, цитрусовые, ананасы и бананы), пальмовое масло, кустарники чая, какао и кофе, табак, сизальская пенька и хлопчатник, а также лекарственные растения, как раувольфия и дигиталис. Как особенно предпочтительные упоминаются картофель, сахарная свекла, сахарный тростник, зерновые, например, пшеница, ячмень и сорго, и рис. Преимущественно GSTIIIc-ДНК согласно изобретению встраивается в геном растений как "чужеродная" ДНК.

Преимущественно, гербициды, в отношении которых согласно изобретению может быть проявлена повышенная устойчивость, относятся к группе гетероарилоксиацетамидов. Особенно предпочтительны при этом гетероарилоксиацетамиды общей формулы (I),



в которой

Het означает в данном случае замещенный гетероароматический остаток преимущественно с пятичленным кольцом, содержащим преимущественно, как минимум, один атом азота и один атом серы или атом кислорода, при этом особенно предпочтительным остатком следует назвать 5-трифторметил-1,3,4-тиадиазол-2-ильный остаток;

R¹ может означать замещенный алкил или алкоксигруппу (в каждом случае предпочтительно содержащую от 1 до 4 атомов углерода); и

R² может означать замещенный арильный остаток (предпочтительно фенильный остаток, который предпочтительно замещен галогеном).

Такие гербициды уже хорошо известны (сравните, например, заявку EP № 18 497 и соответствующий патент США № 4 645 525, заявку EP № 94 541 и соответствующий патент США № 4 585 471, а также заявку EP № 348 737 и соответствующий патент США № 4 968 342). Упомянутые в указанных источниках гербициды особенно

предпочтительны в связи с настоящим изобретением.

В частности предпочитается придание растениям устойчивости по отношению к упомянутому в заявке EP № 348 737 и в соответствующем патенте США № 4 968 342 гербициду с химическим названием: N-изопропил-N-(4-фторфенил) амид (5-трифторметил-1,3,4-тиадиазол-2-ил-окси)уксусной кислоты (предложенное торговое название: тиафлуамид). Эта устойчивость позволяет вводить упомянутый гербицид также в такие культуры, которые в нерезистентной форме были заражены гербицидом неприемлемым способом.

Настоящее изобретение подробнее поясняется следующими примерами осуществления:

I. Выделение GSTIIIc-ДНК из кукурузы.

При выделении GSTIIIc-ДНК используются известные способы и методы молекулярной биологии, которые, например, описываются в, следующем справочнике: Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J: Molecular cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, второе издание, 1989.

Для выделения GSTIIIc-ДНК сначала выделяют белок в чистом виде из этиолированных ростков кукурузы (Zea mays) сорта Mutin (1) и полностью определяют аминокислотную последовательность с помощью анализа последовательности белка (2). Также из ростков кукурузы выделяют мРНК (3) и с помощью обратной транскриптазы ферментативно переводят в кДНК (4). Полученную таким образом кДНК встраивают в качестве матрицы в полимеразную цепную реакцию (Mullis K.B., Faloona F. A., (1987), Methods Enzymol. 155:335-350) для выделения GSTIIIc-ДНК.

1. Выделение GSTIIIc-белка из кукурузы, сорта Mutin

Для очистки GSTIIIc-белка ростки кукурузы переводят в удобное для переработки состояние и смешивают с 0,2М Трис/НСl, рН7,8, 1мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТК) (2мл/г живого веса). Суспензию центрифугируют и белковую фракцию надосадочной жидкости получают при фракционированном осаждении сульфатом аммония с насыщением 30% и 70%. Выделение GSTIIIc-белка осуществляют при хроматографии на следующих колонках в приведенных буферах:

А) Сефадекс G-100 (среда для разделения на декстрановой основе), объем 500мл (Pharmacia)

Буфер: А: 50мМ фосфат калия, рН7,3

Б) ДЭАЭ-сефароза (матрица из поперечно-сшитой агарозы с ковалентно присоединенной диэтиламиноэтильной группой), объем 50мл (Pharmacia)

Буфер А: 10мМ фосфат калия, рН7,3

Буфер Б: 1,0М фосфат калия, рН7,3

Градиент: 0-100% Б в 500мл

В) Глутатион-сульфобромфталейн-агароза, объем 20мл (Sigma)

Буфер: А: 50мМ фосфат калия, рН7,3

Буфер: Б: 50мМ фосфат калия, рН8,0, 5мМ глутатион

Г) Моно Q HR 5/5 (анионообменная смола на основе поперечно-сшитой агарозы с заряженными триметиламмонийметильными группами, размер частиц 10 ± 5 мкм), объем 1мл (Pharmacia)

Буфер: А: 20мМ Трис/НСl, рН7,5

Буфер: Б: 20мМ Трис/НСl, рН8,0, 1,0М хлористый натрий

Градиент: 0-25%Б в 20мл

2. Анализ последовательности GSTIIIc-белка

Выделенный из кукурузы (сорта Mutin) GSTIIIc-белок подвергают восстановлению, карбоксиметилированию и диализу против 0, 2М гидрокарбомата аммония (Glazer A.M., Delange R. J., Sigman D. S., (1975), "Chemical modification of proteins", изд. Elsevier Biomedical Press, Амстердам). Последующее расщепление белка эндопротеазами Asp-N (с чистотой для секвенирования, Бёрингер Маннхайм) или трипсином (обработанным N-тозил-L-фенилаланинхлорметилкетонем, Worthington) проводят при 23°C в течение 16 часов при соотношении белок - протеаза 1 : 100. Реакцию расщепления прекращают при добавлении 0,1% трифторуксусной кислоты. Нерастворимые пептиды отделяются при центрифугировании, растворимые пептиды отделяют друг от друга с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в следующих условиях:

Колонка: Vydac C 18 (гель для разделения на основе двуоксида кремния с алифатическими цепочками (Cis)), 0,46см X 25см

Элюент А: 0,1% трифторуксусная кислота

Элюент Б: 0,1% трифторуксусная кислота, 90% ацетонитрил

Градиент: 0 - 60% Б в 40мин

Скорость потока: 0, 25мл/мин

Аминокислотную последовательность выделенных пептидов определяют с помощью секвенаторов белка 470A и 473A (Applied Biosystems). Полная белковая последовательность GSTIIIc-белка представлена последовательностью SEQ ID № 2.

3. Выделение поли(А) + мРНК из кукурузы (сорт Mutin)

GSTIIIc-ДНК, мРНК и соответствующие кДНК содержат нуклеотидные последовательности, которые могут быть производными друг друга. Для выделения GSTIIIc-ДНК сначала приготавливают полиаденилированную мРНК из этиолированных ростков кукурузы. Выделение осуществляют с помощью шариков фирмы Динал с олигр(тимидин)₂₅ в соответствии с протоколом изготовителя (Dynal, Осло, Норвегия; Jakobsen K.S., Breivold E., (1990), Nucleic Acids Res. 18:3669). Этот способ очистки поли(А) + мРНК основывается на связывании пар оснований между поли(А)+ остатки мРНК на 3' конце и остатками олиго(тимидина), которые ковалентно

связываются на поверхности магнитных металлических шариков (шарики фирмы Dynal). На 1 мг таких шариков вставляют 0,2 мг растительного материала. Выделенная таким способом мРНК используется для ферментативного синтеза кДНК без дальнейшей очистки.

4. Ферментативный синтез кДНК

Получение кДНК проводится с помощью "First Strand cDNA Synthesis Kit" (Pharmacia P-L Biochemicals Inc.). Этот способ основывается на ферментативной активности вирусных ДНК-полимераз (обратных транскриптаз), которые синтезируют ДНК по матрице РНК (Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.

В соответствии с данными изготовителя реакцию проводят следующим образом:

5 мкм поли(А) + мРНК из кукурузы сорта Mutin смешивали с 1 мкм 0,5 М дитиоэритрита, 1 мкм праймера (тимидин)₁₅₋₁₈ 11 мкм реакционной смеси (основная реакционная смесь), состоящей из обратной транскриптазы мыши, 135 мМ Трис/НСl, рН 8,3, 204 мМ хлористого калия, 27 мМ хлористого магния, 0,24 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 5,4 мМ дезоксиаденозин-5'-трифосфата, дезоксицитидин-5'-трифосфата, дезоксигуанозин-5'-трифосфата, тимидин-5'-трифосфата.

После проведения реакции в течение одного часа при 37°C мРНК удаляют при щелочном гидролизе. Синтезированную кДНК осаждают и используют в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции.

5. Амплификация, клонирование и установление последовательности GSTIIIc-ДНК.

Для выделения GSTIIIc-ДНК нуклеотидную последовательность, кодирующую GSTIIIc, сначала подвергают амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (Mullis K.B., Faloona FA, (1987), *Methods Enzymol.* 155:335-350). Матрицей для реакции служит кДНК, полученная из мРНК кукурузы. Для специфического обогащения GSTIIIc-ДНК используют праймер 1 (прямой) согласно последовательности SEQ ID № 3 и праймер 2 (обратный) согласно последовательности SEQ ID № 4.

Получают реакционные смеси следующего состава:

5 мкм кДНК (200 нг/мкл)

1 мкм 50 мМ праймера

1 мкм 50 мМ праймера 2

4 мкл 250 мМ дезоксиаденозин - 5' - трифосфата, дезоксицитидин - 5' - трифосфата, дезоксигуанозин-5'-трифосфата, тимидин-5'-трифосфата

5 мкл 200 мМ Трис/НСl, рН 8,8, 100 мМ хлористого калия, 60 мМ сульфата аммония, 15 мМ хлористого магния, 1% Тритона X-100

34 мкл воды.

Полимеразную цепную реакцию осуществляют в термоустройстве для управления циклом при амплификации гена при полимеразной цепной реакции (9600-Thermocycler, Perkin Elmer).

В качестве устойчивой к нагреванию полимеразы прибавляют 1 мкл бляшкообразующей единицы ДНК-полимеразы (Stratagene, 2500 Ед./мл). Всего проводят 35 реакционных циклов при следующих температурах и времени реакции: 45 секунд при 94°C, 45 секунд при 58°C, 45 секунд при 72°C. Амплифицированный фрагмент ДНК, содержащий кодирующую GSTIIIc нуклеотидную последовательность, очищают с помощью электрофореза на агарозном геле и, как уже описывали, клонируют в векторе рЕТ3а.

Полную последовательность ДНК GSTIIIc-ДНК (SEQ ID № 1) определяют с помощью набора для секвенирования последовательностей ДНК с использованием секвенназы (United States Biochemical, Cleveland) (Sanger F., Coulson R., (1975), *J.Mol. Biol.* 94:441-448).

II. Трансформация риса

Трансформация риса (*Oryza sativa*) может быть проведена в соответствии со способами, описанными в следующей литературе:

Zhang H. M., Yang H., Rech E. L., Golds T. J., Davis A. S., Mulligan B. J., (1988). Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7:379-384.

Zhang W., Wu R., (1988). Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plant. *Theor. Appl. Gen.* 76:835-840.

Shimamoto K., Terada R., Izawa T., Fujimoto H., (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338:274-276.

Datta S. K., Peterhans A., Datta K., Potrykus I., (1990). Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplast. *Biotechnol.* 6:736-740.

Hayashimoto A., Li Z., Murai N., (1990). A polyethylene glycol-mediated transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol.* 93:857-863.

Для переноса вектора рSS-GSTIIIc в рмс использовали способ Hayashimoto и др. (1990) без изменений.

Устойчивые к канамицину трансформанты были проконтролированы в экспериментах с Нозерн-блоттингом на экспрессию GSTIIIc-белка обнаружили с помощью специфических антител. Ферментативная активность белка может быть продемонстрирована в экстракте-сырце трансформированных растений риса по наличию катализируемой ферментом модификации гербицида, N-изопропил-N-(4-фторфенил)амида (5-трифторметил-1,3,4-тиа диазол-2-ил-окси)уксусной кислоты.

Трансгенные растения риса проявляют устойчивость по отношению к указанному гербициду по сравнению с нетрансформированными контрольными растениями.

III. Трансформация табака

а) Культивирование побегов табака и выделение протопластов табака:

Табак (Petit Havana SRI) размножают при стерильном культивировании побегов на среде ЛС без гормонов

(Linsmeier Skoog, (1965)). С промежутками примерно в 6 - 8 недель пересаживают кусочки побегов на свежую среду ЛС. Культуры побегов содержатся при освещении 12 часов (1000-3000лк) в помещении для культивирования при 24-26°C.

5 Для выделения протопластов листьев около 2г листьев (длиной примерно 3-5см) разрезают чистым лезвием на маленькие кусочки (0,5 x 1см). Листовой материал инкубируют в 20мл ферментного раствора, состоящего из среды КЗ (Nady и Maliga, 1976). 0,4М сахарозы, рН5,6, 2% целлюлазы R10 (Sen/a), 0,5% мацероцима R10 (Serva), в течение 14-16 часов при комнатной температуре. Затем протопласты отделяют от остатков клеток при
10 фильтрации через стальное сито 0,3мм и 0,1мм. Фильтрат центрифугируют 10 минут при 100 X g. Во время такого центрифугирования интактные протопласты всплывают и собираются в слой на поверхности ферментного раствора. Осадок из остатков клеток и ферментный раствор отсасывают с помощью стеклянного капилляра. К предварительно очищенным протопластам добавляют свежую среду КЗ (0,4М сахара как осмотический раствор) до 10мл и заново дают им всплыть. Среду для промывки отсасывают, а протопласты разбавляют до 1-2 X 10⁵/мл для культивирования или последующего заражения агробактериями

15 (сокультивирование). Концентрацию протопластов определяют в счетной камере.
б) Построение вектора рSS-GSTIIIc и перенос в агробактерию tumefaciens GSTIIIc-ДНК и последовательность Шайна-Дальгарно вырезались в виде фрагмента XbaI/BamHI из вектора рЕТ3а-GSTIIIc, подвергались очистке и клонированию в плазмиде Bluescript II Sk +/- (Stratagene, La Jolla, Калифорния), в дальнейшем обозначаемой как рBS-SKII. Использовались рестрикционные сайты XbaI и BamHI. Затем
20 GSTIIIc-ДНК вырезали по сайтам рестрикции SstI и SmaI из вектора рBS-SKII-GSTIIIc, выделяли и лигировали в вектор рRT101 (линеаризированный SstI/ SmaI) (Topfer R., Matzeit V., Gronenborn B., Schell J., Steinbifl H. H., (1987), Nucleic Acids Res. 14:5890).

Затем GSTIIIc-ДНК выделяли в чистом виде как фрагмент EcoRI/SmaI из вектора рRT10I-GSTIIIc и клонировали в экспрессирующем векторе рSS (линеаризированном EcoRI/SmaI, (YOB A. и др., Molec. Breeding
25 1:15-26(1995)).

Вместо названных векторов могут быть задействованы любые другие экспрессирующие векторы и промежуточные векторы, содержащие соответствующие рестрикционные сайты, при этом специалист, располагая вышеупомянутыми данными, может легко сделать подходящий выбор. Получающийся в результате
30 промежуточный вектор рSS-GSTIIIc, который содержит GSTIIIc-ДНК, переносится на Agrobacterium tumefaciens, содержащий функциональный участок vir (Koncz и Schell, 1986, van Haute и др., 1983).

в) Трансформация регенерирующих протопластов табака путем сокультивирования с Agrobacterium tumefaciens

В дальнейшем используется способ Мартона и др., 1979, с небольшими изменениями. Протопласты выделяют, как описано, и инкубируют при плотности 1-2 x 10⁵/мл в среде КЗ (0,4 М сахара, А-нафтилуксусная
35 кислота в концентрации 0,1мг/мл, 0,2мг кинетина) в течение 2 дней в темноте и 1-2 дня при слабом освещении (500лк) при 26°C.

Как только появляются первые части протопластов, прибавляют к 3мл регенерирующих протопластов 30мкл суспензии агробактерии согласно разделу б) в минимальном количестве среды А (Ам) (плотность около 109 агробактерий/мл). Продолжительность сокультивирования составляет 3-4 дня при 20°C в темноте. После чего
40 клетки табака помещают в пробирки для центрифугирования емкостью 12мл, разбавляют морской водой (600мОсм/кг) до 10мл и осаждают центрифугированием при 60 X g в течение 10 минут. Эту процедуру промывки повторяют еще 1-2 раза, чтобы удалить наибольшую часть агробактерии. Клеточную суспензию культивируют при плотности 5 X 10⁴/мл в среде КЗ (0,3М сахара) с А-нафтилуксусной кислотой в концентрации 1мг/л, кинетином в концентрации 0,2мг/л и цефалоспориновым антибиотиком цефотаксимом в концентрации 500мг/л.
45 Клеточную суспензию каждую неделю разбавляют свежей средой КЗ, и величина осмотического давления среды постепенно понижается с уменьшением молярности раствора сахарозы на 0,05М (около 60мОсм/кг) за неделю. Селекцию с канамицином канамицинсульфат 100мг/л /Sigma/, 660мг/г активного канамицина) начинают через 2-3 недели после сокультивирования в агарозе, применяя "шариковый тип культивирования" (Shillito и др., 1983). Устойчивые к канамицину колонии можно различить на фоне оставшихся колоний через 3-4 недели после
50 начала селекции.

г) Прямая трансформация протопластов табака с ДНК. Трансформация с использованием нитрата кальция и полиэтиленгликоля.

В чашке Петри осторожно смешивают около 10⁶ протопластов в 180мкл среды КЗ с 20мкл водного раствора ДНК, содержащего 20мкг плазмиды рSS-GSTIIIc. Плазмиду рSS-GSTIIIc получают известным способом из
55 плазмид рЕТ3а-GSTIIIc, рRT101, рBS-SKII и рSS. Затем осторожно прибавляют 200мкл раствора для слияния (0,1М азотнокислый кальций, 0,45М маннит, 25% полиэтиленгликоль/ПЭГ 6000/, рН9). Через 15 минут добавляют 5мл промывного раствора (0,275М азотнокислый кальций, рН6) и еще через 5 минут протопласты переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 60 X g. Осадок после центрифугирования помещают в небольшое количество среды КЗ и культивируют, как описано в следующем ниже разделе.
60 Альтернативно можно трансформировать протопласты по Haiп и др., 1985.

д) Культивирование инкубированных с ДНК протопластов и селекция устойчивых к канамицину каллюсов:

Для описываемых далее культивирования и селекции устойчивых к канамицину колоний используется модифицированная методика "шарикового типа культивирования" (Shillito и др., 1983). Через неделю после
65 обработки протопластов с помощью ДНК (сравните с разделом г) смешивают в чашке Петри диаметром 5см суспензию клеток (3мл) с 3мл среды КЗ (0,3М сахара + гормон; 1,2% низкоплавящаяся агароза (Морские

Коллоиды)). Для этой цели агарозу в сухом виде автоклавируют и после добавления среды КЗ быстро кипятят в микроволновой печи. После затвердевания агарозы кружочки агарозы ("шарики") вместе с включенными внутрь микрокаллюсами табака переносят для дальнейшего культивирования и селекции в чашки Петри диаметром 10см и прибавляют по 10мл среды КЗ (0,3М сахара, А-нафтилуксусная кислота в концентрации 1мг/л, кинетин в концентрации 0,2мг/л) и ка-намицинсульфат /100мг/л/ (Sigma). Жидкую среду заменяют каждую неделю. При этом осмотическое давление среды ступенчато понижается. За неделю в обмениваемой среде (КЗ + канамицин) молярная концентрация сахара понижается на 0, 05М (около 60мОсм). Схема селекции устойчивых к канамицину колоний табака после трансформации с помощью ДНК:

Сахароза в жидкой среде					
0,4 М	0,3 М	0,25 М	0,20 М	0,15 М	0,10 М
П	В	С	К		
1	2	3	4	5	6

Недели после поглощения ДНК

(Среда КЗ А-нафтилуксусная кислота 1мг/л, кинетин 0,2мг/л)

П = поглощение ДНК

В = включение в агарозу

С = селекция с канамицином (канамицинсульфат 100мг/л)

К = устойчивые к канамицину колонии, которые можно однозначно различить на фоне

е) Регенерация устойчивых к канамицину растений:

Как только устойчивые к канамицину колонии достигают диаметра около 0,5см, половину помещают на среду для регенерации (среда ЛС, 2% сахара, бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5мг/л) и выдерживают при освещении в течение 12 часов (3000-5000лк) и при температуре 24°C в помещении для культивирования. Другую половину размножают в виде культуры каллюса на среде ЛС с А-нафтилуксусной кислотой в концентрации 1мг/л, кинетином в концентрации 0,2мг/л, БАП в концентрации 0,1мг/л и канамицинсульфатом в концентрации 100мг/л. Когда регенерированные побеги достигают величины около 1см, их вырезают и помещают на 1/2 среды ЛС (1% сахара, 0,8% агар) без регуляторов роста для того, чтобы они пустили корни. Побеги пускают корни на 1/2 среды ЛС с канамицинсульфатом в концентрации 100мг/л, а позднее их пересаживают в землю.

ж) Трансформация пластинок листьев под действием агробактерии *tume-faciens*.

Для трансформации пластинок листьев (Horsch и др., 1985) листья длиной 2-3см после стерильного культивирования побегов нарезают пластинками диаметром в 1см и инкубируют с суспензией соответствующих агробактерии (около 10⁹/мл) (сравните с разделом в) в среде Ам, см. ниже) примерно в течение 5 минут. Зараженные кусочки листьев выдерживают в среде Murashige и Skoog (МС) без гормонов в течение 3-4 дней при температуре около 24°C. В течение этого времени агробактерия прорастает на кусочках листьев. Эти кусочки листьев затем промывают в среде МС (БАП 0,5мг/ мл, А-нафтилуксусная кислота 0,1мг/мл) и помещают на подобную среду (0,8% агар) с цефотаксимом в концентрации 500мкг/мл и канамицинсульфатом в концентрации 100мкг/мл. Через две недели среду следует обновить. Трансформированные устойчивые к канамицину побеги видны через следующие 2-3 недели.

Биохимические способы доказательства трансформации

Ферментативный тест с неомицин-фосфотрансферазой (НФТ II):

Активность НФТ II в тканях растений определяют путем *in situ* фосфорилирования канамицина, как описано ReiB и др. (1984) и модифицировано Schreier и др. (1985), следующим образом. При прибавлении стеклянного порошка гомогенизируют во льду 50мг ткани растений в 50мкл буфера для экстракции (10% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола, 0,1% додецилсульфата натрия, 0,025% бромфенолового синего, 62, 5мМ Трис, рН6,8) и в течение 10 минут центрифугируют при 4°C в центрифуге Эппендорфа. Надосадочную жидкость в количестве 50мкл переносят в нативный полиакриламидный гель (145 X 110 X 1,2мм; гель для разделения: 10% акриламида, 0,33% бисакриламида, 0,375М Трис, рН8,8, гель для сбора: 5% акриламида, 0,165% бисакриламида, 0,125М Трис, рН6,8) и подвергают электрофорезу в течение ночи при 4°C и 60В. Как только индикатор бромфеноловый синий выделяется из геля, гель промывают дважды дистиллированной водой в течение 10 минут и один раз 30 минут буфером для реакции (67мМ Трис-малеат, рН7,1; 42мМ хлористый магний, 400мМ хлористый аммоний). Гель помещают на стеклянную пластину такого же размера и покрывают сверху 40мл 1%-ной агарозы в буфере для реакции, содержащем в качестве субстратов канамицинсульфат (20мкг/ мл) и меченный ³²P аденозин-5'-трифосфат (Amersham) с радиоактивностью 20-200мкКи. Сэндвич-гель инкубируют 30 минут при комнатной температуре, а затем на агарозу укладывают лист фосфоцеллюлозной бумаги P81 (Whatman). На него укладывают в четыре слоя фильтровальную бумагу 3ММ (Whatman) и несколько бумажных полотенец. Перенос фосфорилированного *in situ* радиоактивного канамицинофосфата на бумагу P81 прекращается через 3-4 часа. Бумагу P81 инкубируют 30 минут в растворе протеиназы К и 1% додецилсульфата натрия при 60°C, а затем промывают 3-4 раза в 250мл 10мМ фосфатного буфера с рН7,5 при 80°C, сушат и подвергают автордиографии в течение 1-12 часов при -70°C (пленка Kodak XAR5).

Все результаты в процентах как в вышеупомянутых, так и в приводимых далее примерах, рассчитываются как весовые проценты, если не указано иначе.

В полученных таким образом в соответствии с вышеуказанными примерами клетках растений и растениях присутствие GSTIIIc-ДНК устанавливали с помощью анализа с использованием Саузерн-блоттинга. Экспрессию GSTIIIc-ДНК подтверждали анализом с использованием Нозерн-блоттинга и Вестерн-блоттингом с помощью специфических антител.

Далее описываются некоторые среды, применяемые при трансформации растений или клеток растений:
Среда Ам

5	3,5г	вторичного кислого фосфата калия
	1,5г	первичного кислого фосфата калия
	0,5г	цитрата натрия
	0,1г	сульфата магния гептагидрата
	1г	сульфата аммония
10	2г	глюкозы в 1л

Среда для стерильного культивирования побегов табака

Макроэлементы 1/2 концентрации солей среды МС

Микроэлементы 1/2 концентрации солей среды МС

Fe-ЭДТК (среда Murashige и Skoog)

15		
		Миоинозит 100 мг/л
		Сахароза 10 мг/л
		Агар 8 мг/л
20		Витамины 1 мг/л
		пантотенат кальция
		биотин 10 мг/л
		никотиновая кислота 1 мг/л
		пиридоксин 1 мг/л
25		тиамин 1 мг/л

pH5,7 перед автоклавированием

Среда КЗ

Для культивирования табака *Nicotiana tabacum* petit Havanna SR1, табака *Nicotiana tabacum* Wisconsin 38 и протопластов табака *Nicotiana plumaginifolia* (Nagy и Maliga, 1976)

30		
		Макроэлементы 250мг/л
		нитрат аммония
		нитрат калия 2500мг/л
35		хлористый кальций дигидрат 900мг/л
		сульфат магния гептагидрат 250мг/л
		мононатрийфосфат гидрат 150мг/л
		вторичный кислый фосфат кальция гидрат 50мг/л
		Микроэлементы 3мг/л
40		орто-борная кислота
		сульфат марганца (2) гидрат 10мг/л
		сульфат цинка тетрагидрат 2мг/л
		йодистый калий 0,75мг/л
		молибдат натрия дигидрат 0,25мг/л
		сульфат меди (2) пентагидрат 0,025мг/л
45		хлорид кобальта (2) гексагидрат 0,025мг/л
		Fe-ЭДТК 37,2мг/л
		динатриевая соль ЭДТК
		сульфат железа (2) гептагидрат 27,8мг/л
		Инозит 100мг/л
50		Сахароза 137мг/л
		(=0,4M)
		Ксилоза 250 мг/л
		Витамины 1мг/л
		никотиновая кислота
55		пиридоксин 1мг/л
		тиамин 10мг/л
		Гормоны 1мг/л
		А-нафтилуксусная кислота
		кинетин 0,2 мг/л

pH5,6

стерилизовать на фильтре

Среда Линсмайера и Скуга (Linsmaier и Skoog, 1965)

Для культивирования регенерирующих протопластов и для культивирования ткани опухолей табака и каллюса. Среда Линсмайера и Скуга (ЛС) представляет из себя среду Мурашиге и Скуга (Murashige и Skoog, 1962) со следующими модификациями:

65

Тиамин используется в более высокой концентрации 0,4мг/л вместо 0,1мг/л;
Глицин, пиридоксин и никотиновая кислота отсутствуют.

5	Макроэлементы	1650мг/л
	нитрат аммония	
	нитрат калия	1900мг/л
	хлористый кальций дигидрат	440мг/л
	сульфат магния гептагидрат	370мг/л
10	первичный кислый фосфат калия	170мг/л
	Микроэлементы	6,2мг/л
	орто-борная кислота	
	сульфат марганца(2) гидрат	22,3мг/л
	сульфат цинка тетрагидрат	8,6мг/л
15	йодистый калий	0,83мг/л
	молибдат натрия дигидрат	0,25мг/л
	сульфат меди (2) пентагидрат	0,025мг/л
	хлорид кобальта (2) гексагидрат	0,025мг/л
	Fe-ЭДТК	37,2мг/л
20	динатриевая соль ЭДТК	
	сульфат железа (2) гептагидрат	27,8мг/л
	Инозит	100мг/л
	Сахароза	30мг/л
	Агар	8мг/л
25	Витамины	0,4мг/л
	тиамин	
	Гормоны	1мг/л
	А-нафтилукусная кислота	
	кинетин	0,2мг/л

30 рН5,7

Повышенная устойчивость трансформированных согласно изобретению растений поясняется следующим опытом:

Подтверждение повышенной устойчивости трансформированных растений:

35 Для доказательства повышенной устойчивости по отношению к обладающим гербицидным действием гетерооксацетиамидам определяют заражение трансформированных согласно изобретению растений при сравнении с контрольными растениями. В качестве испытываемого гербицида используют N-изо-пропил-N-(4-трифторфенил)амид (5-трифторметил-1,3,4-тиадиазол-2-ил-окси) уксусной кислоты.

40 Семена поколения F1 трансформированных растений помещают в оранжерею в горшки (диаметром 11см) с землей, содержащей 3% перегноя. Выращивание растений осуществляют при температуре 23°C и относительной влажности воздуха 70 - 80%. Обработка вышеназванным гербицидом в форме 70%-ного смачиваемого порошка производится через 24 часа после высаживания семян с использованием концентраций, соответствующих затраченному количеству в 2000-4000г активного вещества/га.

45 Оценку производят через 20 дней после обработки гербицидом. Оценивается в процентах общий вред, нанесенный трансгенным растениям, по сравнению с соответствующими контрольными растениями, которые были обработаны такими же концентрациями активного вещества.

Трансформированные табачные растения, в которые встраивали GSTIIIc-ДНК согласно изобретению, показали четкую повышенную устойчивость по отношению к высоким затраченным количествам гербицида (2000-4000г/га) по сравнению с нетрансформированными соответствующими контрольными растениями.

Протокол последовательностей

50 (1) Общая информация:

(i) Заявитель:

(А) Название: Байер.АГ

(Б) Улица: Байерверк

(В) Город: Леверкузен

55 (Г) Страна: Германия

(Д) Почтовый индекс: D-51368

(Е) Телефон: 0214/30 66400

(Ж) Телефакс: 0214/30 3482

(З) Телекс: 85 101 -265 (d)

60 (ii) Название изобретения: Дезоксирибонуклеиновая кислота, кодирующая глутатион-S-трансферазу,

(iii) Число последовательностей: 4

(iv) Форма компьютерного представления данных:

(А) Носитель данных: дискета

(Б) Компьютер: IBM-совместимый ПК

65 (В) Операционная система: PC-DOS/MS-DOS

(Г) Программное обеспечение: Patentin Release #1.0, версия #1. 30

(2) Информация к SEQ ID № 1:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 666 пар нуклеотидов

(Б) Вид: нуклеотид

(В) Форма цепи: одонитевая

(Г) Топология: линейная

(ii) Вид молекулы: кДНК

(iii) Гипотетическая: нет

(iv) Антисмысловая: нет

(N) Признак:

(A) Название/код: CDS

(Б) Положение: 1.663

(xii) Описание последовательности: SEQ ID № 1:

5
15
ATG GCG CCT CTG AAG CTG TAC GGG ATG CCG CTG TCC CCC AAC GTG GTG 48
Met Ala Pro Leu Lys Leu Tyr Gly Met Pro Leu Ser Pro Asn Val Val
1 5 10 15

20
CGC GTG GCC ACC GTG CTC AAC GAG AAG GGC CTC GAC TTC GAG ATC GTC 96
Arg Val Ala Thr Val Leu Asn Glu Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ile Val
20 25 30

25
CCC GTC GAC CTC ACC ACC GGC GCC CAC AAG CAG CCC GAC TTC CTC GCC 144
Pro Val Asp Leu Thr Thr Gly Ala His Lys Gln Pro Asp Phe Leu Ala
35 40 45

30
CTC AAC CCT TTC GGC CAG ATC CCG GCT CTC GTC GAC GGA GAC GAA GTC 192
Leu Asn Pro Phe Gly Gln Ile Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp Glu Val
50 55 60

35
CTC TTC GAG TCC CGT GCG ATC AAC CCG TAC ATC GCC AGC AAG TAC GCG 240
Leu Phe Glu Ser Arg Ala Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Ser Lys Tyr Ala
65 70 75 80

40
TCG GAG GGC ACS GAC CTG CTC CCC GCG ACG GCG TCG GCG GCG AAG CTG 288
Ser Glu Gly Thr Asp Leu Leu Pro Ala Thr Ala Ser Ala Ala Lys Leu
85 90 95

45
GAG GTG TGG CTG GAG GTG GAG TCG CAC CAC TT CCAC CCG AAC GCG TCG 336
Glu Val Trp Leu Glu Val Glu Ser His His Phe His Pro Asn Ala Ser
100 105 110

50
CCG CTG GTG TTC CAG CTG CTC GTG AGG CCG CTC CTG GGC GGC GCC CCC 384
Pro Leu Val Phe Gln Leu Leu Val Arg Pro Leu Leu Gly Gly Ala Pro
115 120 125

55
GAC GCG GCG GTG GTG GAG AAG CAC GCG GAG CAG CTC GCC AAG GTG CTC 432
Asp Ala Ala Val Val Glu Lys His Ala Glu Gln Leu Ala Lys Val Leu
130 135 140

60
GAC GTG TAC GAG GCG CAC CTG GCC CGC AAC AAG TAC CTC GCC GGG GAC 480
Asp Val Tyr Glu Ala His Leu Ala Arg Asn Lys Tyr Leu Ala Gly Asp
145 150 155 160

65
GAG TTC ACG CTC GCC GAC GCC AAC CAC GCG TCC TAC CTG CTC TAC CTC 528
Glu Phe Thr Leu Ala Asp Ala Asn His Ala Ser Tyr Leu Leu Tyr Leu
165 170 175

70
AAG AAC ACC CCC AAG GCC GGG CTC GTC GCC GCC CGC CCC CAC GTC AAG 576
Ser Lys Thr Pro Lys Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg Pro His Val Lys
180 185 190

У
5
1
6
4
2
С
2

С
2
5
1
6
4
2
У
А

GCC TGG TGG GAG GCC ATC GCC GCC CGC CCC GCG TTC CAG AAG ACC GTC 624

Ala Trp Trp Glu Ala Ile Ala Ala Arg Pro Ala Phe Gln Lys Thr Val

195 200 205

5

GCC GCC ATC CCC TTG CCC CGC CGC CCC TCC TCC TCG GCT TGA 666

Ala Ala Ile Pro Leu Pro Pro Pro Ser Ser Ser Ala

210 215 220

(2) Информация к последовательности SEQ ID № 2:

10

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 221 аминокислота

(Б) Вид: аминокислота

(Г) Топология: линейная

(ii) Вид молекулы: белок

15

(xi) Описание последовательности: SEQ ID № 2:

Met Ala Pro Leu Lys Leu Tyr Gly Met Pro Leu Ser Pro Asn Val Val

1 5 10 15

20

Arg Val Ala Thr Val Leu Asn Glu Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ile Val

20 25 30

Pro Val Asp Leu Thr Thr Gly Ala His Lys Gln Pro Asp Phe Leu Ala

35 40 45

25

Leu Asn Pro Phe Gly Gln Ile Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp Glu Val

50 55 60

30

Leu Phe Glu Ser Arg Ala Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Ser Lys Tyr Ala

65 70 75 80

35

Ser Glu Gly Thr Asp Leu Leu Pro Ala Thr Ala Ser Ala Ala Lys Leu

85 90 95

40

Glu Val Trp Leu Glu Val Glu Ser His His Phe His Pro Asn Ala Ser

100 105 110

Pro Leu Val Phe Gln Leu Leu Val Arg Pro Leu Leu Gly Gly Ala Pro

115 120 125

45

Asp Ala Ala Val Val Glu Lys His Ala Glu Gln Leu Ala Lys Val Leu

130 135 140

50

Asp Val Tyr Glu Ala His Leu Ala Arg Asn Lys Tyr Leu Ala Gly Asp

145 150 155 160

55

60

65

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2

Glu Phe Thr Leu Ala Asp Ala Asn His Ala Ser Tyr Leu Leu Tyr Leu

165 170 175

5

Ser Lys Thr Pro Lys Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg Pro His Val Lys

180 185 190

10

Ala Trp Trp Glu Ala Ile Ala Ala Arg Pro Ala Phe Gln Lys Thr Val

195 200 205

Ala Ala Ile Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ser Ala

15

210 215 220

(2) Информация к последовательности SEQ ID № 3:

(i) Характеристика последовательности:

(B) Длина: 33 пары нуклеотидов

20

(Б) Вид: нуклеотид

(C) Форма цепи: однонитевая

(Г) Топология: линейная

(ii) Вид молекулы: кДНК

(iii) Гипотетическая: нет

25

(iv) Антисмысловая: нет

(xi) Описание последовательности: SEQ ID. № 3:

(2) Информация к последовательности SEQ ID. №;4:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 30 пар нуклеотидов

30

(Б) Вид: нуклеотид

(B) Форма цепи: однонитевая

(Г) Топология: линейная

(ii) Вид молекулы: кДНК

(iii) Гипотетическая: нет

35

(iv) Антисмысловая: нет

(xi) Описание последовательности: SEQ ID № 4:

Формула винаходу

40

1. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота), яка кодує білок глутатіон-S-трансферазу IIIc (GSTIIIc) з послідовністю:

45

50

55

60

65

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2

Met Ala Pro Leu Lys Leu Tyr Gly Met Pro Leu Ser Pro Asn Val Val
 1 5 10 15
 Arg Val Ala Thr Val Leu Asn Glu Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ile Val
 20 25 30
 Pro Val Asp Leu Thr Thr Gly Ala His Lys Gln Pro Asp Phe Leu Ala
 35 40 45
 Leu Asn Pro Phe Gly Gln Ile Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp Glu Val
 50 55 60
 Leu Phe Glu Ser Arg Ala Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Ser Lys Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Gly Thr Asp Leu Leu Pro Ala Thr Ala Ser Ala Ala Lys Leu
 85 90 95
 Glu Val Trp Leu Glu Val Glu Ser His His Phe His Pro Asn Ala Ser
 100 105 110
 Pro Leu Val Phe Gln Leu Leu Val Arg Pro Leu Leu Gly Gly Ala Pro
 115 120 125
 Asp Ala Ala Val Val Glu Lys His Ala Glu Gln Leu Ala Lys Val Leu
 130 135 140
 Asp Val Tyr Glu Ala His Leu Ala Arg Asn Lys Tyr Leu Ala Gly Asp
 145 150 155 160
 Glu Phe Thr Leu Ala Asp Ala Asn His Ala Ser Tyr Leu Leu Tyr Leu
 165 170 175
 Ser Lys Thr Pro Lys Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg Pro His Val Lys
 180 185 190
 Ala Trp Trp Glu Ala Ile Ala Ala Arg Pro Ala Phe Gln Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Ala Ile Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ser Ala
 210 215 220

2. ДНК згідно з п. 1, яка відрізняється тим, що має послідовність

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2

ATG GCG CCT CTG AAG CTG TAC GGG ATG CCG CTG TCC CCC AAC GTG GTG 48
 Met Ala Pro Leu Lys Leu Tyr Gly Met Pro Leu Ser Pro Asn Val Val
 1 5 10 15
 5
 CGC GTG GCC ACC GTG CTC AAC GAG AAG GGC CTC GAC TTC GAG ATC GTC 96
 Arg Val Ala Thr Val Leu Asn Glu Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ile Val
 20 25 30
 10
 CCC GTC GAC CTC ACC ACC GGC GCC CAC AAG CAG CCC GAC TTC CTC GCC 144
 Pro Val Asp Leu Thr Thr Gly Ala His Lys Gln Pro Asp Phe Leu Ala
 35 40 45
 15
 CTC AAC CCT TTC GGC CAG ATC CCG GCT CTC GTC GAC GGA GAC GAA GTC 192
 Leu Asn Pro Phe Gly Gln Ile Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp Glu Val
 50 55 60
 20
 CTC TTC GAG TCC CGT GCG ATC AAC CGG TAC ATC GCC AGC AAG TAC GCG 240
 Leu Phe Glu Ser Arg Ala Ile Asn Arg Tyr Ile Ala Ser Lys Tyr Ala
 65 70 75 80
 25
 TCG GAG GGC ACG GAC CTG CTC CCC GCG ACG GCG TCG GCG GCG AAG CTG 288
 Ser Glu Gly Thr Asp Leu Leu Pro Ala Thr Ala Ser Ala Ala Lys Leu
 85 90 95
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

U A 5 1 6 4 2 C 2

U A 5 1 6 4 2 C 2

5 GAG GTG TGG CTG GAG GTG GAG TCG CAC CAC TTC CAC CCG AAC GCG TCG 336
 Glu Val Trp Leu Glu Val Glu Ser His His Phe His Pro Asn Ala Ser
 100 105 110

10 CCG CTG GTG TTC CAG CTG CTC GTG AGG CCG CTC CTG GGC GGC GCC CCC 384
 Pro Leu Val Phe Gln Leu Leu Val Arg Pro Leu Leu Gly Gly Ala Pro
 115 120 125

15 GAC GCG GCG GTG GTG GAG AAG CAC GCG GAG CAG CTC GCC AAG GTG CTC 432
 Asp Ala Ala Val Val Glu Lys His Ala Glu Gln Leu Ala Lys Val Leu
 130 135 140

20 GAC GTG TAC GAG GCG CAC CTG GCC CGC AAC AAG TAC CTC GCC GGG GAC 480
 Asp Val Tyr Glu Ala His Leu Ala Arg Asn Lys Tyr Leu Ala Gly Asp
 145 150 155 160

25 GAG TTC ACG CTC GCC GAC GCC AAC CAC GCG TCC TAC CTG CTC TAC CTC 528
 Glu Phe Thr Leu Ala Asp Ala Asn His Ala Ser Tyr Leu Leu Tyr Leu
 165 170 175

30 AGC AAG ACC CCC AAG GCC GGG CTC GTC GCC GCC CGC CCC CAC GTC AAG 576
 Ser Lys Thr Pro Lys Ala Gly Leu Val Ala Ala Arg Pro His Val Lys
 180 185 190

35 GCC TGG TGG GAG GCC ATC GCC GCC CGC CCC GCG TTC CAG AAG ACC GTC 624
 Ala Trp Trp Glu Ala Ile Ala Ala Arg Pro Ala Phe Gln Lys Thr Val
 195 200 205

40 GCC GCC ATC CCC TTG CCC CCG CCG CCC TCC TCC TCG GCT TGA 666
 Ala Ala Ile Pro Leu Pro Pro Pro Ser Ser Ser Ala
 210 215 220

3. ДНК згідно з п. 1, яка відрізняється тим, що має послідовність ДНК GSTIIIc, яка міститься у векторній плазміді pET3a- GSTIIIc.

45 4. ДНК згідно з будь-яким з пп. 1-3, яка відрізняється тим, що існує у формі дволанцюгової ДНК, яка містить ДНК згідно з будь-яким пп. 1-3 та комплементарний до неї ДНК-ланцюг.

5. ДНК згідно з будь-яким з пп. 1-4, яка відрізняється тим, що на 5'-кінці кодуючої послідовності знаходиться діючий в рослинах промотор.

6. ДНК згідно з п. 5, яка відрізняється тим, що промотором є CaMV 35S або подвійний промотор CaMV 35S, що складається з енансера CaMV 35S і промотору CaMV 35S.

50 7. ДНК згідно з п. 5, яка відрізняється тим, що представляє собою конструкт, що містить ДНК GSTIIIc і подвійний промотор CaMV 35S, як він представлений у векторній плазміді pSS-GSTIIIc.

8. Білок з амінокислотною послідовністю, представленою в п. 1.

9. Білок згідно з п. 8, який відрізняється тим, що існує в димерній формі.

55 Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 12, 15.12.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

60

65