



(51) МПК

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011127438/10, 02.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
02.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
05.12.2008 US 61/120,179

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2013 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: DATABASE:Unreviewed,UniProtKB/TrEMBL, Q2TJK5 (Q2TJK5\_9SOLA), 24.01.2006. SARAH PICAUD, et al., "Expression, purification and characterization of recombinant (E)-b-farnesene synthase from *Artemisia annua*", *Phytochemistry*, 66 (2005), pp. 961-967. US 2006/137032 A1, 22.06.2006. EA 2111 B1, 24.12.2001. RU 2005113300 A, 27.10.2005

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 05.07.2011

(86) Заявка РСТ:  
NL 2009/000244 (02.12.2009)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2010/064897 (10.06.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДЕ БОТ, Михил ,Теодор, Ян (NL),  
СХЮРИНК, Роберт, Корнелис (NL),  
АМЕНТ, Кай (NL),  
ХАРИНГ, Михаэль, Альбертус (NL)

(73) Патентообладатель(и):

КИНДЖИН Н.В. (NL)

**(54) ФАРНЕЗЕН-СИНТАЗА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Представлены: выделенный из томата полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, представленной в описании, или полинуклеотид, который имеет, по меньшей мере, 70% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, или их фрагмент, которые кодируют полипептид с

активностью фарнезен-синтазы, соответствующий SEQ ID NO:2, представленной в описании, или имеющий, по меньшей мере, 70% идентичность с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2, или их фрагмент. Описаны генетические конструкции, содержащие указанный полинуклеотид, где генетические конструкции представляют собой

трансформационный вектор и экспрессионный вектор. Раскрыт трансформационный вектор, содержащий полинуклеотид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим указанный полипептид. Описана клетка-хозяин для экспрессии фарнезен-синтазы, содержащая генетическую конструкцию, выбранную из указанных. Предложен способ получения альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, включающий стадии культивирования указанной клетки-хозяина с получением повышенной активности альфа-фарнезен-синтазы и/или активности бета-фарнезен-синтазы; и необязательно получения клетки с фарнезилдифосфатом; и выделения полученных альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена. Раскрыт способ модулирования

продуцирования растением альфа-фарнезена и бета-фарнезена, включающий повышение или уменьшение экспрессии указанной фарнезен-синтазы, где указанного повышения или уменьшения достигают с помощью генетической модификации для изменения экспрессии полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид. Предложено применение полинуклеотида по настоящему изобретению для картирования молекулярного (ДНК) маркера, связанного с указанной нуклеотидной последовательностью. Изобретение позволяет получать альфа-фарнезен и бета-фарнезен в клетке-хозяине. 13 н. и 3 з.п. ф-лы, 8 ил., 1 табл., 1 пр.

RU 2 5 4 6 8 7 7 C 2

RU 2 5 4 6 8 7 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 9/88* (2006.01)  
*C12N 15/29* (2006.01)  
*C12N 15/60* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011127438/10, 02.12.2009**

(24) Effective date for property rights:  
**02.12.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**05.12.2008 US 61/120,179**

(43) Application published: **10.01.2013** Bull. № 1

(45) Date of publication: **10.04.2015** Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: **05.07.2011**

(86) PCT application:  
**NL 2009/000244 (02.12.2009)**

(87) PCT publication:  
**WO 2010/064897 (10.06.2010)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**DE BOT, Mikhail ,Teodor, Jan (NL),  
SKhJuRINK, Robert, Kornelis (NL),  
AMENT, Kaj (NL),  
KhARING, Mikhaehl', Al'bertus (NL)**

(73) Proprietor(s):

**KINDZhin N.V. (NL)**

**(54) FARNESENE-SYNTASE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Claimed are: a separated from the tomato polynucleotide, corresponding to SEQ ID NO: 1, presented in the description, or a polynucleotide, which has, at least, a 70% identity with the nucleotide sequence SEQ ID NO:1, or their fragment, which code a polypeptide with the activity of farnesene-synthase, corresponding to SEQ ID NO:2, presented in the description, or having, at least, a 70% identity with an amino acid sequence, corresponding to SEQ ID NO:2, or their fragment. Genetic constructions, containing the said polynucleotide, where genetic constructions represent a transformation vector and an expression vector are described. Described is the transformation vector, which contains the polynucleotide which is hybridised with a polynucleotide, coding the said polypeptide. A host cell for expression farnesene-synthase, which contains a genetic construction, selected from the said ones, is described. Claimed is a method

of obtaining alpha-farnesene and/or beta-farnesene, including stages of the said host cell cultivation with obtaining the increased activity of alpha-farnesene synthase and/or activity of beta-farnesene-synthase and optionally obtaining a cell with farnesyldiphosphate; and the separation of the obtained alpha-farnesene and/or beta-farnesene. Described is a method of modulating the production of alpha-farnesene and beta-farnesene by a plant, which includes an increase or reduction of expression of the said farnesene-synthase, where the said increase or reduction is achieved by means of genetic modification to change the expression of polynucleotide, coding the said polypeptide. Claimed is the application of the polynucleotide in accordance with the claimed invention for coding a molecular (DNA) marker, bound with the said nucleotide sequence.

EFFECT: invention makes it possible to obtain alpha-farnesene and beta-farnesene in the host cell.

16 cl, 8 dwg, 1 tbl, 1 ex

### Сущность изобретения

Новая фарнезен-синтаза была выделена из томата. Фарнезен-синтаза демонстрирует неожиданные свойства в отношении образующихся конечных продуктов, а также в отношении того, что на нуклеотидном уровне ее ген обладает низкой идентичностью по последовательности с известными генами фарнезен-синтазы из других источников. Изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, к полипептидам, кодируемым указанными полинуклеотидами, к генетическим конструкциям, векторам, хозяевам, в частности, к растениям, несущим такие полинуклеотиды, полипептиды и генетические конструкции, и к семенам, происходящим из таких растений.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к ферменту фарнезен-синтазы, в частности, к альфа-фарнезен-синтазе и/или бета-фарнезен-синтазе. Оно также относится к полинуклеотидным последовательностям, кодирующим такой фермент. Изобретение также относится к конструкциям нуклеиновых кислот (или к генетическим конструкциям), векторам и клеткам-хозяевам, включающим полинуклеотидные последовательности. Оно дополнительно относится к получению и применению альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена.

### Уровень техники

Термин "фарнезен" относится к группе из шести близкородственных химических соединений, которые представляют собой сесквитерпены. Альфа-фарнезен и бета-фарнезен являются изомерами, отличающимися расположением одной двойной связи. Альфа-фарнезен представляет собой 3,7,11-триметил-1,3,6,10-додекатетраен, и бета-фарнезен представляет собой 7,11-диметил-3-метил-1,6,10-додекатриен. Альфа-фарнезен может существовать в виде четырех стереоизомеров, которые отличаются по конфигурации двух из его трех внутренних двойных связей (стереоизомеры третьей внутренней двойной связи идентичны). Бета-фарнезен существует в виде двух стереоизомеров в конфигурации его центральной двойной связи. Пока недостаточно понятны различия между разнообразными изомерами обоих альфа-фарнезена и бета-фарнезена, в том, что касается конкретной функции этих изомеров.

Альфа-фарнезен либо конститутивно присутствует в широком спектре видов или индуцируется в них (Gapper et al., *Postharvest Biology and Technology* 42: (2006) 225-233). Считается, что альфа-фарнезен синтезируется из фарнезилдифосфата (FDP) в реакции, которая протекает при образовании карбокатионного промежуточного соединения, и имеется публикация по поводу того, что реакция катализируется ферментом альфа-фарнезен-синтазой (Rupasinghe, et al., *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123,882-886 (1998)). Бета-фарнезен встречается у широкого спектра таксонов как растений, так и животных. Были опубликованы разнообразные статьи о встречаемости этого натурального продукта и его применении в качестве важного агента химической коммуникации. Бета-фарнезен обнаружен в эфирном масле многих видов растений, как голосемянных, так и покрытосемянных, включая *Chamomilla recutita*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* и *Piper nigrum*. (E)-бета-фарнезен-синтаза индуцируется фитофагом египетской хлопковой совки (*Spodoptera littoralis*) в оболочке маиса и в ткани листьев, но не в тканях корней (Schnee et al., *Plant Physiol.*, 2002, 130: 2049-2060). Считается, что бета-фарнезен синтезируется из FDP в реакции, включающей ионизацию дифосфорного эфира, которой способствуют двухвалентный ион металла, и депротонирование от C-3 метильной группы полученного в результате карбокактиона, как раскрыто в WO 1999/18118.

Что касается его функций, то описано, что альфа-фарнезен является приманкой для насекомых и действует в качестве полового феромона у мышей и насекомых. Он

действует как феромон тревоги у *Prorhinotermes canalifrons* (Sobotnik et al. (2008) *J. Chem. Ecol.* 34(4):478-86). В других случаях альфа-фарнезен и его производные применяют в качестве сильнодействующих противораковых агентов и при синтезе полимерных пленок (US20060137032. Hernandez-ceruelos et al. (*Toxicol. Lett.* 135: 103-110, 2005), где  
5 сообщается об антимуtagenных эффектах  $\beta$ -фарнезена, главного компонента основы масла обыкновенной ромашки, на мышинные клетки костного мозга после мутагенных обработок).

Бета-фарнезен был описан в качестве главного компонента запаха пыльцы в Люпинах (*Lupinus*) и компонента, стимулирующего опыленческое поведение у шмелей (Dobson  
10 et al. (1996) *Am. J. Bot.* 83, 877-885). Более важно, что описано применение бета-фарнезена у видов растительной тли в качестве феромона тревоги, например, для *Aphis gossypii* (тля бахчевая) (Jianwei et al., 2006, *J. Econ. Entomol.* 99 (5): 1636-1640; Kislow and Edwards, 1972, *Nature* 235: 108-109; Pickett and Griffiths, 1980, *J. Chem. Ecol.* 6: 349-360) и для *Myzus persicae* (тля оранжерейная) (Edwards, L.J., 1973, *Nature* 241: 126-127). Тля, подвершаяся  
15 действию бета-фарнезена, становится возбужденной и рассеивается от растения-хозяина (Wohlers (1981) *Z Angew. Entomol.* 92, 329-336). Бета-фарнезен резко токсичен для тли в дозе 100 нг на тлю (van Oosten et al. (1990) *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 25, 331-342). Также представляет интерес то замечание, что пары бета-фарнезена токсичны для белокрылки (Klijnstra et al. (1992) *Meded Fac. Landbouwwet.* 57, 485-491). К сожалению,  
20 усилия по контролю за поведением тли при местном применении бета-фарнезена к сельскохозяйственным культурам имело небольшой успех из-за нестабильности и быстрой окислительной инактивации на воздухе (Dawson et al. (1988) *Pest. Sci.* 22, 17-30).

У Schnee et al (*Plant Physiology* Vol. 130, pp 2049 (2002) описана терпен-синтаза, катализирующая образование (E)-бета-фарнезена. В WO 2004/035791 раскрыта альфа-  
25 фарнезен-синтаза из *Malus domestica*. В WO 99/18118 раскрыта (E)-бета-фарнезен-синтаза из *Mentha piperita*.

#### Сущность изобретения

В первом аспекте предлагается полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, и его гомологи. Нуклеотид может кодировать полипептид с активностью фарнезен-  
30 синтазы, в частности, с активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или с активностью бета-фарнезен-синтазы.

В следующем аспекте изобретения предлагается полипептид, соответствующий SEQ ID NO:2, и его гомологи. Полипептид может обладать активностью фарнезен-синтазы, в частности, активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-  
35 синтазы.

Еще в одном аспекте изобретения предлагается генетическая конструкция, вектор, содержащий такую генетическую конструкцию, и клетка-хозяин, содержащая генетическую конструкцию, где генетическая конструкция содержит полинуклеотид согласно изобретению.

40 Еще в одном аспекте изобретения предлагается трансгенное растение или растительная клетка, содержащие такую генетическую конструкцию, и семена, происходящие из таких растений или растительных клеток.

Еще в одном аспекте изобретения предлагается способ получения альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, включающий применение полинуклеотида по изобретению.

45 Еще в одном аспекте изобретения предлагается способ модулирования продуцирования растением альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, включающий регуляцию уровня экспрессии полипептидов, кодируемых полинуклеотидами по изобретению.

Вышеупомянутые аспекты и другие преимущества настоящего изобретения будут более понятны, если их лучше объяснить с помощью ссылки на следующее подробное описание и примеры при их совместном рассмотрении с прилагаемыми чертежами, описание которых приведено в описании изобретения и в примерах.

#### 5 Определения

В следующем описании изобретения и в примерах используются следующие термины. С целью предложения ясного и последовательного объяснения описания изобретения и формулы изобретения, включая рамки, имеющиеся для таких терминов, предлагаются следующие определения. До тех пор, пока в настоящем документе не определено иначе, все используемые технические и научные термины, имеют такое же значение, как и те, что обычно подразумевается специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Описание всех публикаций, патентных заявок, патентов и другой литературы включено в настоящий документ в полном объеме с помощью ссылки.

15 "Фарнезен-синтаза" относится к ферменту, который способен преобразовывать фарнезилдифосфат в альфа-фарнезен и/или бета-фарнезен.

"Активность фарнезен-синтазы" относится к способности фарнезен-синтазы по настоящему изобретению катализировать образование альфа-фарнезена, бета-фарнезена или обоих из фарнезилдифосфата. Активность измеряют анализом ферментной 20 активности, таким как анализ, описанный в примере. Варианты аминокислотных последовательностей фарнезен-синтаз по настоящему изобретению могут обладать требуемой измененной биологической активностью, включая, например, измененную кинетику реакции, использование субстрата, распределение продукта или другие характеристики, такие как стереохимия.

25 "Генетическая конструкция" относится к молекуле полинуклеотида, как правило, двухцепочечной ДНК, которая может быть вставлена в другую молекулу полинуклеотида (вставочная молекула полинуклеотида), такую как, но без ограничения, молекулу кДНК. Генетическая конструкция может содержать необходимые элементы, которые позволяют транскрибироваться полинуклеотидной молекуле-вставке и, 30 необязательно, транслироваться в полипептид. Полинуклеотидная молекула-вставка может происходить из клетки-хозяина, или может иметь происхождение из отличной клетки или организма, и/или может представлять собой рекомбинантный полинуклеотид. Оказавшись внутри клетки-хозяина генетическая конструкция может интегрироваться в хромосомную ДНК хозяина. Генетическая конструкция может быть связана с 35 вектором.

Термин "ген" означает последовательность ДНК, содержащую область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, мРНК) в клетке, функционально связанную с подходящими регуляторными областями (например, с промотором). Таким образом, ген может содержать несколько 40 функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5' лидерная последовательность, содержащая, например, последовательности, вовлеченные в инициацию трансляции, (белок) кодирующую область (кДНК или геномная ДНК) и 3' нетранслируемую последовательность содержащую, например, участки терминации транскрипции.

45 "Клетка-хозяин" относится к прокариотической или эукариотической клетке. Типичные прокариотические клетки-хозяева включают различные штаммы *E. coli*. Типичными эукариотическими клетками-хозяевами являются клетки-растений, клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки животных.

"Процент идентичности последовательности" означает процент аминокислот или нуклеотидов, которые занимают одинаковое относительное положение, когда две аминокислотные последовательности или две нуклеотидные последовательности выровнены параллельно. Длина последовательностей, которые необходимо сравнить, для нуклеиновых кислот обычно составляет, по меньшей мере, 120 нуклеотидов, предпочтительно 200 нуклеотидов, и еще более предпочтительно 300 нуклеотидов, а длина последовательностей, которые необходимо сравнить, для полипептидов составляет, по меньшей мере, 40 аминокислотных остатков, предпочтительно 65 аминокислотных остатков, а еще более предпочтительно 100 аминокислотных остатков. Предпочтительно "процент идентичности последовательности" определяют выравниваниями с помощью Clustal W. Выравнивания vClustal W проводили с помощью программного обеспечения "CLC Free Workbench 3" компании CLC Bio, Cambridge, MA, USA. Эта программа находится в свободном доступе на веб-сайте <http://www.clcbio.com>. Параметрами, которые используют для нуклеотидных и для аминокислотных выравниваний, являются штраф за внесение пропуска 10 и штраф за продолжение пропуска 1. Концы пропусков оценивали как все другие пропуски.

В настоящем описании "полинуклеотид(ы)" означает одно- или двуцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований и включают ДНК и соответствующие молекулы РНК, в смысловой и в антисмысловой ориентациях, и охватывает кДНК, геномную ДНК и рекомбинантную ДНК, а также полностью или частично синтезированные полинуклеотиды. Полинуклеотид может состоять из целого гена или из любой его части. Функциональные антисмысловые полинуклеотиды могут содержать фрагмент соответствующего полинуклеотида, и, следовательно, определение "полинуклеотид" включает все такие функциональные антисмысловые фрагменты.

"Выделенный полинуклеотид" является нуклеотидной молекулой, которая идентифицирована и отделена от, по меньшей мере, одного загрязняющего полинуклеотида, с которым она обычно связана.

В настоящем описании "полипептид(ы)" включают пептиды, полипептиды и белки.

"Выделенный полипептид" является полипептидом, который был идентифицирован и отделен или выделен, чтобы быть в значительной степени свободным от компонентов его естественного окружения. Термин включает полипептиды *in situ* в рекомбинантных клетках. Однако, как правило, выделенные полипептиды, получают, по меньшей мере, за одну стадию очистки.

Термины "генетический маркер", или "полиморфный маркер", или "молекулярный маркер" относятся к области на геномной ДНК, которая может быть применена для "отметки" конкретного места на хромосоме. Если генетический маркер тесно связан с геном или находится "в" гене, то он "маркирует" ДНК, на которой ген обнаружен, и может, следовательно, быть использован в анализе с (молекулярным) маркером (см. ниже) для определения присутствия или отсутствия гена, например, в методах выведения/отбора с маркером (MAS). Примерами генетических маркеров является ПДАФ (AFLP) (Полиморфизм Длины Амплифицированных Фрагментов), микросателлитов, ПДФР (RFLP) (полиморфизм длины фрагментов рестрикции), ДНК-маркирующий сайт (STS), однонуклеотидный полиморфизм (SNP), полиморфизм одиночного признака (SFP) (Single Feature Polymorphism; см. Borevitz et al. 2003, Genome Research 13: 513-523), SCAR (амплифицированный участок с известной последовательностью), маркеры CAPS (рестрикционный полиморфизм амплифицированных последовательностей) и т.п. Чем дальше маркер находится от гена, тем больше вероятность, что будет иметь место рекомбинация (кроссинговер) между маркером и геном, в результате чего будет потеряна

связь (и совместная сегрегация маркера и гена). Дистанцию между генетическими локусами измеряют в терминах частот рекомбинации, представленную в сМ (сантИМорганах, 1 сМ - это частота мейотической рекомбинации между двумя маркерами, равная 1%). Поскольку размеры генома сильно варьируют между видами и поскольку распределение событий рекомбинации не является случайной по геному, реальное физическое расстояние, представленное 1 сМ (т.е. тысячи пар оснований, т.п.о., между двумя маркерами), также значительно варьирует между и в пределах видов. Следует понимать, что, если речь в данном описании идет о маркерах или "связанных" маркерах, то также охваченными оказываются маркеры "в" самом гене.

"Анализ молекулярных маркеров" (или тест) относится к основанному на ДНК анализу, который указывает (прямо или опосредованно) на присутствие или отсутствие полинуклеотида по изобретению в растении или части растения.

#### Подробное описание

Задача изобретения заключается в предложении новых полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фарнезен-синтазы, фермента(ов), кодируемого такими полинуклеотидами, способов синтеза *in vitro* альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, и/или генетически модифицированных растений для изменения в них уровня активности альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, и в предоставлении для общего доступа полезного выбора доступных ферментов.

Неожиданно было обнаружено, что указанная выше проблема может быть решена путем предоставления выделенного полинуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1, или полунуклеотида, которые имеет, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1. Предпочтительно, если указанный полинуклеотид кодирует фарнезен-синтазу, т.е. фермент, который может синтезировать альфа-фарнезен и/или бета-фарнезен из подходящего субстрата. Следовательно, в другом воплощении предлагается полинуклеотид по изобретению, в котором указанный полинуклеотид кодирует полипептид с активностью фарнезен-синтазы.

Нуклеотид SEQ ID NO:1 согласно изобретению является кодирующей последовательностью гена фарнезен-синтазы, кодирующего фарнезен-синтазу полученную из томата, *Solanum lycopersicon* сорта Money Maker, как описано подробно в методах. Как будет объяснено с дополнительными подробностями ниже, фарнезен-синтаза по изобретению обладает неожиданными характеристиками в сравнении с фарнезен-синтазами, известными в данной области, не только в отношении различий в идентичности последовательностей полинуклеотидов, но, главное, в отношении фарнезен-синтазы, кодируемой таким полинуклеотидом.

Специалисту должно быть понятно, что также предлагаются такие полинуклеотиды, которые имеют, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

В контексте настоящего изобретения, идентичность последовательности может быть и была определена с помощью выравнивания ClustalW. Выравнивания ClustalW проводили с помощью программного обеспечения "CLC Free Workbench 3" компании CLC Bio, Cambridge, MA, USA. Эта программа находится в свободном доступе на веб-сайте <http://www.clcbio.com>. Параметрами, которые используют и для нуклеотидных, и

для аминокислотных выравниваний, являются штраф за внесение пропуска 10 и штраф за продолжение пропуска 1. Концы пропусков расценивали как все другие пропуски.

С помощью указанного выравнивания ClustalW было подсчитано, что полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1 демонстрирует (только) 36% идентичность с известной Е-бета-фарнезен-синтазой, выделенной из *Zea mays* (Schee et al.2002), 46% идентичности с известной альфа-фарнезен-синтазой, выделенной из *Malus domestica* (WO 2004/035791), и 48% идентичности с известной Е-бета-фарнезен-синтазой из *Mentha x piperita* (WO 99/18118).

В другом воплощении, в настоящем изобретении также предлагаются полинуклеотиды, которые отличаются от полинуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1, в 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотиде(ах), отличаются вставкой, делецией или заменой в полинуклеотидной последовательности, соответствующей SEQ ID NO:1. Такие вставки, делеции или замены могут иметь место в отношении соседних нуклеотидов, но также могут относиться к различным, например, 2, 3, 4 или 5 положениям в пределах полинуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1. Например, нуклеотид в первом положении может быть удален, два нуклеотида во втором положении могут быть заменены, тогда как в третьем положении в пределах нуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1, может быть вставлен один или несколько нуклеотидов.

(Выделенный) полинуклеотид по изобретению может быть в виде кДНК, или соответствующей РНК, синтетического полинуклеотида, но он также включает полинуклеотид, содержащий интроны и экзоны. Специалисту следует понимать, что полинуклеотид по изобретению может дополнительно содержать, в дополнение к области, кодирующей фарнезен-синтазу в соответствии с изобретением, регуляторные последовательности, включая, предпочтительно, промоторную область, например, промоторную область фарнезен-синтазы по изобретению.

Также предлагаются фрагменты полинуклеотида по изобретению, при условии, что такой фрагмент полинуклеотида по изобретению кодирует полипептид, обладающий активностью фарнезен-синтазы. Активность фарнезен-синтазы может быть определена различными способами, известными в данной области, но предпочтительно определена подробно в приложенных примерах.

Как обсуждалось выше, было обнаружено, что полинуклеотид по изобретению, например, полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, кодирует полипептид с активностью фарнезена. В частности, было обнаружено, что полипептид по изобретению кодирует полипептид, способный образовывать альфа-фарнезен и/или бета-фарнезен. Полинуклеотид по изобретению, может, в этом воплощении, таким образом, использоваться для образования альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена.

Кроме того, результаты продемонстрировали присутствие (+)-валенцена (valencene), предполагая что полипептиды согласно изобретению могут также использоваться для образования (+)-валенцена. Таким образом, в описании настоящего документа, где делается ссылка на полипептид согласно изобретению, дополнительно к активности альфа-фарнезен-синтазы и/или активности бета-фарнезен-синтазы, полипептид согласно изобретению также может демонстрировать активность (+)-валенцен-синтазы, т.е. с образованием (+)-валенцена.

Альфа-фарнезен может существовать в форме четырех различных стереоизомеров: (Z,E)-альфа-фарнезена, (Z,Z)-альфа-фарнезена, (E,Z)-альфа-фарнезена и (E,E)-альфа-фарнезена. Бета-фарнезен может существовать в виде двух различных стереоизомеров: (E)-бета-фарнезена и (Z)-бета-фарнезена.

В следующем воплощении предлагается полинуклеотид согласно изобретению, где

полинуклеотид кодирует полипептид, обладающий активностью альфа-фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы.

Неожиданно было обнаружено, что полинуклеотид(ы) согласно изобретению может кодировать полинуклеотид(ы) согласно изобретению, которые способны к синтезу  
5 обоим, альфа-фарнезена и бета-фарнезена, как продемонстрировано в примерах. Напротив, другие фарнезен-синтазы, известные заявителю, например, которые раскрыты в WO 2004/035791 и WO 99/18118, описаны только как образующие или альфа-фарнезены, или бета-фарнезены. Например, и предпочтительно, полинуклеотид(ы) согласно изобретению может кодировать полинуклеотид(ы) согласно изобретению, который  
10 способен синтезировать (E)-бета-фарнезен, (Z,E)-альфа-фарнезен, (E,E)-альфа-фарнезен и (Z,Z)-альфа-фарнезен.

Было обнаружено, что например, полипептид, кодируемый полинуклеотидом, соответствующим SEQ ID NO:1, обладает активностью, направленной на синтез как альфа-фарнезена, так и бета-фарнезена (в частности, (E)-бета-фарнезена, (Z,E)-альфа-фарнезена, (E,E)-альфа-фарнезена и (Z,Z)-альфа-фарнезена). В настоящем изобретении  
15 было впервые обнаружено, что полинуклеотид согласно изобретению, например, выделенный из растения томата (*Solanum lycopersicon* сорта Money Maker), кодирует полипептид, имеющий свойство синтезировать оба различных стереоизомера, альфа-фарнезен и бета-фарнезен. Действительно, синтез обоих, альфа-фарнезена и бета-фарнезена, в таком растении томата, например, в *Solanum lycopersicon* сорта Money Maker, не был прежде описан, и является неожиданным.  
20

Теперь это впервые дает возможность получения полинуклеотида согласно изобретению, который может использоваться для образования альфа-фарнезена, бета-фарнезена или их обоих. Кроме того, это впервые дает возможность использования  
25 такого полинуклеотида, который кодирует полипептид, для дальнейшего объяснения связи между полинуклеотидом и кодируемым полипептидом и его активностью по отношению к синтезу различных фарнезенов как *in vivo*, так и *in vitro*. Например, это можно объяснить так, что могут быть получены мутанты, обладающие, например, (повышенной) активностью бета-фарнезен-синтазы и не обладающие (или обладающие  
30 пониженной) активностью альфа-фарнезен-синтазы. Варианты аминокислотной последовательности фарнезен-синтазы по настоящему изобретению также могут обладать требуемой измененной биологической активностью, включающей, например, измененную кинетику реакции, утилизацию субстрата, распределение продукта или другие характеристики, такие как стереохимия.

Кроме того, с использованием полипептидов согласно изобретению теперь стало возможным синтезировать определенные смеси или сочетания альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена как *in vivo*, так и *in vitro*, используя при этом только один полинуклеотид или полипептид. Например, полинуклеотид согласно изобретению может быть введен в растение или в бактерию, или полипептид согласно изобретению может использоваться  
40 в *in vitro*-системе для синтеза альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена.

С использованием полинуклеотида согласно изобретению специалист может иметь эффективные средства контроля синтеза различных фарнезенов, как будет ниже объяснено более подробно, поскольку ген может использоваться для трансформации, например, восприимчивых генотипов растений с продуцированием таким образом  
45 генетически трансформированных растений, обладающих измененным синтезом различных типов фарнезенов.

В предпочтительном воплощении полинуклеотида согласно изобретению предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, соответствующий

SEQ ID NO:2, или полипептид, который имеет, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2.

Было обнаружено, что, в частности, полинуклеотид, кодирующий полипептид, соответствующий SEQ ID NO:2, или полипептид, имеющий, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2, преимущественно может использоваться в контексте настоящего изобретения.

В другом воплощении предлагается фрагмент полинуклеотида согласно изобретению, где фрагмент кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или с активностью бета-фарнезен-синтазы, предпочтительно, где фрагмент кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и с активностью бета-фарнезен-синтазы.

Не выходя за рамки настоящего изобретения, следует понимать, что дополнительно к полинуклеотидам, описанным выше, возможны некоторые модификации полинуклеотидов согласно изобретению, без существенного ухудшения такими модификациями активности полипептида, кодируемого таким модифицированным полинуклеотидом. Например, как уже было объяснено выше, полинуклеотид согласно изобретению может содержать такие модификации типа делеций, замен и вставок без существенных помех для активности кодируемого полипептида. Таким образом, в настоящем изобретении также предлагаются фрагменты полинуклеотидов согласно изобретению, которые кодируют полипептиды, которые демонстрируют активность альфа-фарнезен-синтазы и/или активность бета-фарнезен-синтазы (предпочтительно, обеих). Такой фрагмент не ограничен полинуклеотидом конкретного размера или его конкретной частью согласно изобретению при условии, что он обладает активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы (предпочтительно, обеими). С помощью применения методов, приведенных в примерах, или с помощью другого подходящего метода, известного из уровня техники, специалист легко может установить, действительно ли такой фрагмент полинуклеотида согласно изобретению обладает требуемой активностью.

В другом аспекте изобретение относится к полипептидам, кодируемым с помощью полинуклеотидов согласно изобретению. В частности, предлагается полипептид, соответствующий SEQ ID NO:2, или полипептид, который имеет, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2, как определено с помощью выравнивания ClustalW, описанного выше.

В другом воплощении, в настоящем изобретении также предлагаются такие полипептиды, которые отличаются от полипептида, соответствующего SEQ ID NO:2, по 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или по 1 аминокислоте путем вставки, делеции или замены в последовательности полипептида, соответствующего SEQ ID NO:2. Такие вставки, делеции или замены могут иметь отношение к соседним аминокислотам, но также могут присутствовать в различных положениях, например, в 2, 3, 4 или 5 положениях внутри

полипептида, соответствующего SEQ ID NO:2. Например, аминокислота в первом положении может быть делетирована, одна аминокислота во втором положении может быть заменена, тогда как в третьем положении внутри полипептида, соответствующего SEQ ID NO:2, могут быть вставки одного или более нуклеотидов.

5 В предпочтительном воплощении, такие полипептиды согласно изобретению обладают активностью фарнезен-синтазы, предпочтительно активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы, более предпочтительно активностью альфа-фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы. Однако не следует исключать таких полипептидов согласно изобретению, которые лишены  
10 обеих активностей (например, мутантов).

В другом воплощении, предлагается выделенный полипептид альфа-фарнезена и бета-фарнезен-синтазы. Такой полипептид согласно изобретению активен по отношению к синтезу обоих, альфа-фарнезена и бета-фарнезена, например, как может быть  
15 выделен такой полипептид (из растения томат (*Solanum lycopersicon* сорта Money Maker)), который может преимущественно применяться, как описано в настоящем документе.

В другом воплощении предлагается фрагмент полипептида согласно изобретению, где фрагмент обладает активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы, предпочтительно активностью альфа-фарнезена и активностью  
20 бета-фарнезен-синтазы.

Не выходя за рамки настоящего изобретения, следует понимать, что дополнительно к полипептидам, описанным выше, для полипептидов возможны некоторые модификации, если такие модификации существенно не уменьшают активность полипептида. Например, как уже объяснялось выше, полипептид согласно изобретению  
25 может содержать такие модификации типа делеции, замен и вставок аминокислот без существенных помех для активности полипептида. Таким образом, также в настоящем изобретении предлагаются фрагменты полипептидов согласно изобретению, которые обладают активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или (предпочтительно и) активностью бета-фарнезен-синтазы. Такой фрагмент не ограничен полипептидом конкретного  
30 размера или его конкретной частью по изобретению при условии, что он обладает активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы. С помощью применения методов, приведенных в примерах, или с помощью другого подходящего метода, известного из уровня техники, специалист легко может установить, действительно ли такой фрагмент согласно изобретению обладает требуемой  
35 активностью.

Полипептид согласно изобретению или его фрагмент могут дополнительно к активности фарнезен-синтазы использоваться, например, для получения его антител, которые могут использоваться для детектирования полипептида согласно изобретению, например, в растениях.

40 В другом аспекте изобретения, полинуклеотиды согласно изобретению могут использоваться для создания олигонуклеотидов, которые комплементарны одной цепи ДНК-последовательности полинуклеотида согласно изобретению, предпочтительно, последовательности полинуклеотида, соответствующей SEQ ID NO:1, или ее части, и которые могут использоваться в качестве гибридизационных зондов, меченных так,  
45 чтобы позволить детектирование при скрининге геномных ДНК- или кДНК-библиотек на предмет поиска гомологичных генов. В рамки настоящего изобретения включены гомологичные последовательности, которые могут гибридизоваться с зондом при условиях высокой жесткости, и которые кодируют генный продукт, включенный в

фарнезен-синтазу, предпочтительно, обладающий активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы.

Как правило, условия высокой жесткости обозначают условия гибридизации (по Саузерну), которые дают возможность гибридизации последовательности нуклеиновых кислот, состоящей из, по меньшей мере, 50 нуклеотидов, и, предпочтительно, примерно из 200 или более нуклеотидов, с конкретной последовательностью при примерно 65°C в растворе, содержащем, примерно 1 М соль, предпочтительно, 6× SSC, или в любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу, а также которые дают возможность отмывки при примерно 65°C в растворе, содержащем, примерно 0,1 М соль или соль с меньшей концентрацией, предпочтительно, 0,2× SSC, или в любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу (Sambrook, Maniatis, Fritsch, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, CSHL Press, USA, 1987)). Эти условия дают возможность детектирования последовательностей, имеющих идентичность, составляющую примерно 90% или более.

В другом аспекте изобретения олигонуклеотиды конструируют на основе полинуклеотида согласно изобретению так, что они могут использоваться в качестве гибридизационных зондов в анализе по Саузерну. Эти зонды могут использоваться в качестве молекулярных маркеров для того, чтобы различить генотипы растений, обладающих фарнезен-синтазой согласно изобретению, и генотипы растений, лишенных такой фарнезен-синтазы. Такой зонд может использоваться в качестве дополнительного средства в селекции. Например, они могут использоваться в способе детектирования присутствия или отсутствия нуклеотидной последовательности согласно изобретению, кодирующей полипептид согласно изобретению, в ткани растения или в образце его нуклеиновой кислоты, причем способ включает:

- а. Получение образца ткани растения или образца нуклеиновой кислоты,
- б. Анализ образца с использованием анализа молекулярных маркеров на предмет присутствия или отсутствия одного или нескольких маркеров, связанных с полипептидом согласно изобретению, где анализ маркеров детектирует последовательность, соответствующую SEQ ID NO:1, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мер, 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

В предпочтительном воплощении изобретения, олигонуклеотиды конструируют на основе полинуклеотида согласно изобретению так, чтобы они могли использоваться в качестве праймеров при реакции амплификации, такой как полимеразная цепная реакция (ПЦР), посредством которой образование продукта амплификации выявляет присутствие в конкретном генотипе растения фарнезен-синтазы, предпочтительно, фарнезен-синтазы согласно изобретению.

В предпочтительном воплощении, указанные праймеры используются при селективной амплификации фрагмента рестрикции для идентификации AFLP-маркеров, которые тесно связаны с геном фарнезен-синтазы согласно изобретению. Действительно, исключительно удобным методом является AFLP-метод, описанный у Vos, P. et al., *Nucleic Acids Research*, 1995, Vol. 23, No. 21: 4407-4414.

Молекулярные маркеры могут теперь фактически быть получены из полинуклеотидов согласно изобретению. Действительно, предлагаемые нуклеотидные последовательности могут применяться в качестве генетических маркеров для использования в методах молекулярного скрещивания и в скрининге и/или в характеристике зародышевой плазмы.

Такие маркеры могут использоваться в селекции растений, содержащих или не содержащих полинуклеотид или полипептид согласно изобретению.

Таким образом, в настоящем описании предлагается применение, по меньшей мере, 15 последовательно расположенных нуклеотидов из SEQ ID NO:1, или  
5 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90% нуклеотидной идентичности с ней, в качестве молекулярного маркера, предпочтительно, в качестве молекулярного маркера для выделенного полинуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1, или полинуклеотида, имеющего, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по  
10 меньшей мере, 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, или в качестве молекулярного маркера для полинуклеотида согласно любому из пунктов 7-10 формулы изобретения, предпочтительно, для полинуклеотида, обладающего активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы.

Также для применения в картировании молекулярного (ДНК) маркера, связанного с нуклеотидной последовательностью согласно изобретению, предлагается  
15 полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, или полинуклеотид, который имеет, по меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее  
20 предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

Специалисту в данной области понятно, что генетическим (или молекулярным) маркером является ген или ДНК-последовательность с известной локализацией на  
25 хромосоме и ассоциированная с конкретным геном или признаком. Маркер может быть описан в качестве вариации, которая может быть получена благодаря мутации или изменению в геномном локусе, и которая может наблюдаться. Генетическим маркером может быть короткая ДНК-последовательность, такая как последовательность, охватывающая изменение одной пары оснований  
(однонуклеотидный полиморфизм, SNP), или длинная ДНК-последовательность,  
30 подобная минисателлитам.

В настоящем изобретении маркер может представлять собой полинуклеотид (его фрагмент), соответствующий SEQ ID NO:1, или полинуклеотид, который имеет, по  
меньшей мере, 50%, предпочтительно, по меньшей мере, 60%, более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, наиболее  
35 предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

Картирование генетических маркеров внутри гена или по соседству с ним представляет собой процедуру, которая может осуществляться достаточно легко  
40 средним специалистом-молекулярным биологом и которая, например, описана у Lefebvre, V. & A. M. Chevre. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie* 15, 1995 (1): 3-19; Michelmore, R. W. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33 (1995): 393-427; Michelmore, R.W., R.V. Kesseli & E.J. Ryder. Genetic mapping in lettuce. In: R. L. Phillips & I. K. Vasil (eds.) *DNA-based markers in plants*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1994, pp. 223-239; Winter.P. & G. Kahl.  
45 *Molecular marker technologies for plant improvement*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1995, 11 (4): 438-448.

Изобретение также относится к диагностическим наборам, содержащим олигонуклеотиды согласно изобретению, для детектирования в исследуемом генотипе

присутствия или отсутствия гена фарнезен-синтазы согласно изобретению. Такой диагностический набор упрощает применение лабораторных анализов для скрининга на предмет поиска генотипа, образующего, например, альфа-фарнезен и/или бета-фарнезен, или не образующего их.

5 Кроме того, изобретение относится к генетическим конструкциям, содержащим последовательность полинуклеотида согласно изобретению, предпочтительно, кодирующего фарнезен-синтазу согласно изобретению, например, фарнезен-синтазу, имеющую активность альфа-фарнезен-синтазы и/или активность бета-фарнезен-синтазы. Предпочтительно, такая генетическая конструкция дополнительно содержит  
10 регуляторные последовательности, функциональные в растительных клетках, причем указанные регуляторные последовательности, подобные промоторам, либо гомологичны, либо гетерологичны кодирующим последовательностям полинуклеотидов, например, полинуклеотиду соответствующему SEQ ID NO:1, согласно изобретению.

В другом воплощении, генетическая конструкция содержит в направлении 5'-3' полинуклеотид с открытой рамкой считывания, кодирующий полипептид согласно изобретению. В следующем воплощении, генетическая конструкция содержит в направлении 5'-3' полинуклеотид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим полипептид согласно изобретению, предпочтительно, в жестких условиях гибридизации.

20 Изобретение также относится к ДНК-вектору, содержащему ДНК-конструкцию согласно изобретению. Подходящие векторы могут представлять собой клонирующие векторы, трансформирующие векторы, экспрессирующие векторы и так далее, которые хорошо известны специалисту в данной области.

Кроме того, клетки, несущие вектор, содержащий генетическую конструкцию, описанную выше, например, содержащую полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, или его часть, или его гомолог, также находятся в рамках настоящего изобретения.

В одном предпочтительном воплощении изобретения, генетически трансформированное растение получают путем введения полинуклеотида согласно изобретению в геном указанного растения с использованием стандартных методов трансформации. Предпочтительно, указанное генетически трансформированное растение  
30 функционально экспрессирует фарнезен-синтазу согласно изобретению, например, фарнезен-синтазу, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO:2.

В другом воплощении изобретения, полинуклеотиды согласно изобретению могут  
35 быть внесены с использованием в основном известных методов трансформации в гетерологичные системы, такие как, в частности, дыня, табак, *Arabidopsis thaliana*, картофель, сахарная свекла, рапс, огурец, перец, баклажан, хлопок, маис, тыква, арбуз и салат. Также в настоящее изобретение включены такие системы, как бактерии и дрожжи. Введение полинуклеотида согласно изобретению в такие системы дает  
40 возможность получения, например, полипептидов согласно изобретению и, или *in vivo* или *in vitro*, применения таких пептидов для получения фарнезена, предпочтительно, альфа-фарнезенов и бета-фарнезенов.

В другом воплощении изобретения предлагаются семена, происходящие из трансгенного растения или растительной клетки согласно изобретению и, например, содержащие полинуклеотид согласно изобретению, например, соответствующий SEQ ID NO 1.

В другом аспекте предлагается способ получения альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, включающий стадии культивирования клетки, которая была генетически

модифицирована с помощью полинуклеотида согласно изобретению с получением повышенной активности альфа-фарнезен-синтазы и/или бета-фарнезен-синтазы; необязательно получения клетки с фарнезилдифосфатом; и выделения получаемых альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена. Также в настоящий способ включено  
 5 культивирование клетки, происходящей из томата, в частности, томата, используемого в Примерах.

В следующем воплощении предлагается способ модулирования продуцирования растением альфа-фарнезена и бета-фарнезена, причем способ включает повышение или снижение экспрессии фарнезен-синтазы, имеющей полипептидную  
 10 последовательность согласно изобретению, где указанное увеличение или уменьшение достигается с помощью генетической модификации для изменения экспрессии полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид.

Полинуклеотиды и полипептиды, и их фрагменты, и, предпочтительно, кодирующие фарнезен-синтазу или обладающие активностью фарнезен-синтазы, предпочтительно,  
 15 активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы, описанных в настоящем документе, имеют различные применения, некоторые из которых описаны в настоящем документе, но которые не являются ограничением рамок изобретения. Например, полинуклеотиды согласно изобретению могут использоваться для создания растения, (сверх)экспрессирующего фарнезен-синтазу согласно  
 20 изобретению, и которые могут придавать свойство лучшего контроля поведения тли и направлены на отталкивание травоядных насекомых, например, белокрылок.

Настоящее изобретение далее дополнительно описано в примерах с точки зрения выделения полинуклеотида согласно изобретению. Следующие примеры всего лишь иллюстрируют лучший предложенный способ практического осуществления  
 25 изобретения, но которые не следует понимать как ограничение изобретения.

### **Примеры**

#### Растительный материал и Трихома, выделение РНК и мРНК

Растение томат (*Solanum lycopersicon* сорта Money Maker) выращивали в почве в теплице с суточным температурным режимом 23°C - 18°C и 16 ч/8 ч режим свет/темнота  
 30 в течение 4 недель. Осуществляли срез стеблей с меристематической тканью с одного и того же растения, которое помещали в почву и выращивали снова в течение следующих 3 недель. Трихомы стебля и черешки собирали на дно 50-мл пробирки путем встряхивания замороженных в жидком азоте сегментов черешка и стебля.

РНК трихом выделяли с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy plant Mini kit (Dusseldorf, Germany) согласно протоколу производителя для растительных клеток  
 35 и тканей. Лизис проводили с использованием прилагаемого буфера RLT. Матричную РНК выделяли из пула тотальной РНК с использованием набора реагентов PolyAtract mRNA isolation system III фирмы Promega (Madison, Wisconsin, USA) согласно протоколу производителя. мРНК выделяли из тотальной РНК с эффективностью 0,71%.

#### мРНК-амплификация и синтез двухцепочечной кДНК

Использовали набор реагентов MessageAmp II RNA amplification kit от Ambion (Austin, Texas, USA) для амплификации мРНК трихомы. 100 нг мРНК использовали для  
 45 исходного введения при амплификации. Амплификацию проводили согласно протоколу производителя. Выход амплифицированной РНК составил 171 мкг, и распределение размера составило, как ожидалось, ~400-3000 оснований.

Случайные гексамерные праймеры (заказанные от MWG Operon, Ebersberg, Germany) использовали для синтеза первой цепи кДНК из этой амплифицированной РНК в партиях с использованием 10 мкг РНК в реакциях по 20 мкл. Случайные праймеры с

конечной концентрацией 62,5 нМ объединяли с амплифицированной РНК и инкубировали при 70°C в течение 5 минут, после чего хранили смесь на льду. Добавляли обратную транскриптазу RevertAid M-MuIV (200 единиц) от Fermentas Life Sciences (St.Leon-Rot, Germany) вместе с прилагаемым буфером. Добавляли нуклеотиды до конечной концентрации 1 мМ. Синтез кДНК проводили при 42°C в течение 90 минут. Сразу после этого пробирки переносили на лед и синтез второй цепи осуществляли с использованием Fermentas РНКазы Н и ДНК-полимеразы I из E.coli. К каждой реакционной пробирке 20 мкл добавляли 8 мкл прилагаемого реакционного буфера для ДНК-полимеразы I вместе с 1 единицей РНКазы Н и 30 единиц ДНК полимеразы I. Реакционный объем доводили с помощью воды до 100 мкл. Все компоненты добавляли холодными и реакции синтеза второй цепи проводили при 15 °С в течение 2 часов.

#### Крупномасштабное параллельное пиросеквенирование и анализ данных

Поиск двухцепочечной кДНК, получение библиотек, 454-секвенирование, а также контиговое выравнивание осуществляли согласно методам, описанным и известным специалисту из уровня техники. Процессинг, в который вовлечен адаптер для 454-секвенирования со штриховым кодом, осуществляли с каждым из 5 мутантов, несущих отдельный штриховой код (см. например WO 2007073165, WO 2007037678 или WO 2007073165, где отличный штриховой код описан в виде тэга или идентификатора). Само пиросеквенирование известно из уровня техники и описано среди прочего на сайтах [www.biotagebio.com](http://www.biotagebio.com); [www.pyrosequencing.com/section technology](http://www.pyrosequencing.com/section%20technology). Технология дополнительно применяется, например, в WO 03/004690, WO 03/054142, WO 2004/069849, WO 2004/070005, WO 2004/070007, и WO 2005/003375 (все под названием 454 Life Sciences), которые включены в настоящий документ путем ссылки. Методы выравнивания последовательностей для целей сравнения хорошо известны из уровня техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны у: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-244; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Computer Appl. in the Biosci. 8:155-65; and Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-31, которые включены в настоящий документ путем ссылки. В публикации Altschul et al. (1994) Nature Genet. 6:119-29 (включенной в настоящий документ путем ссылки) представлено подробное рассмотрение методов выравнивания последовательностей и расчета гомологии.

#### Идентификация и клонирование сесквитерпен-синтазы томата SISTS3

Один из контигов, генерированных из прочитанных 454-последовательностей (ICLI 17Contig1), длина которого 793 п.о., обладает по сравнению со всеми остальными контигами наиболее высокой степенью идентичности с сесквитерпен-синтазой *Fabiana imbricata* (с неизвестной функцией) мРНК (AY860847). Для получения полноразмерного клона этой кДНК томата осуществляли ПЦР-амплификацию на кДНК-библиотеке, сконструированной с использованием мРНК из трихом томата. Использовали набор реагентов HybriZAP -2.1 XR для конструирования библиотек и набор реагентов для синтеза кДНК HybriZAP - 2.1 XR от Stratagene (Cedar Creek, Texas, USA) согласно протоколу производителя. Размер первичной кДНК-библиотеки составил  $2,5 \times 10^6$  бляшкообразующих единиц (PFU)/мкг плеча фага. Первичную библиотеку амплифицировали согласно протоколу производителя. Эту амплифицированную кДНК-библиотеку разделяли по размеру с использованием протокола Mass Excision Protocol от производителя. Эту разделенную библиотеку использовали для ПЦР-амплификации 3'- и 5'-частей кДНК-фрагмента с использованием праймеров 1-6 (см. список праймеров

в Таблице 1 ниже).

		Таблица 1 Список праймеров
5	1	GGTATTATGGAAAGAAAGTACCAAC 6F3_E
	2	TTCCATAAATGAGATGAAAAAGGTC 6F4_E
	3	TTCCTTCAAATTTCCCTGGTCATT 6R4_E
	4	CTCAACATTCCTTCTACATCC 6R5_E
10	5	TAATACCACTACAATGGATC pActF
	6	AATACGACTCACTATAGGGCTCTA T7long
	7	CACCATGGAGTTGTGCACACAAAC E6TopoF
	8	STATATAATAGGATCAACTAGTATATCAGAGATG E6TopoR
15	9	TTCTTTTCTTGTTCATCGG E6fIR2
	10	CTTGTGAAAAATGGAGTTGTGC E6fIF

Для 5'-части этой кДНК проводили ПЦР с праймером 6R5E и pActF (см. список праймеров) и для 3'-части этой кДНК использовали праймеры 6F4E и T7long. Разделенную кДНК-библиотеку использовали в качестве матрицы с 0,25 единиц полимеразы Phusion Hot Start от Finnzymes (Espoo, Finland) вместе с прилагаемым буфером, каждый праймер использовали в концентрации 0,4 мМ и dNTP в концентрации 0,2 мМ в реакционном объеме 25 мкл. MgCl<sub>2</sub> добавляли к ПЦР-смеси до конечной концентрации 0,3 мМ. Использовали термоциклер T1 от Biometra (Göttingen, Germany) со следующей программой:

- 25 Стадия 1. 98°C в течение 1 минуты
- Стадия 2. 98°C в течение 10 секунд
- Стадия 3. 56°C в течение 30 секунд
- Стадия 4. 72°C в течение 45 секунд
- 30 Стадия 5. Возврат на стадию 2; повтор 34 раза
- Стадия 6. 72°C в течение 5 минут
- Стадия 7. 4°C до момента взятия из термоциклера.

Продукты реакции разводили в 20 раз водой для использования в качестве матрицы для повторной амплификации. Повторную амплификацию 5'-части проводили с использованием праймеров 6R4E и pActF и для повторной амплификации 3'-части использовали праймеры 6F3E и T7long. Условия ПЦР были такими же, как и для первичных реакций ПЦР.

Продукты ПЦР-реакций повторной амплификации вырезали из геля и выделяли с помощью набора Gel Extraction Kit от QIAGEN в соответствии с протоколом производителя. Продукты ПЦР секвенировали с помощью набора ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit.

45 Вместе с вновь отсеквенированными фрагментами кДНК контиг, полученный из 454-последовательностей, может быть расширен до полноразмерной кодирующей последовательности путем сборки перекрывающихся фрагментов последовательности. Были сконструированы новые праймеры (праймеры E6fIR2 и E6fIF, см. список праймеров), которые применяли для амплификации ПЦР полноразмерной кодирующей последовательности из разделенной кДНК-библиотеки. Полноразмерную амплификацию осуществляли с полимеразой для горячего старта Phusion от Finnzymes, как описано выше.

ПЦР-фрагмент, полученный в этой реакции ПЦР, вырезали из геля и выделяли с помощью набора Gel Extraction Kit от QIAGEN в соответствии с протоколом производителя. Впоследствии, этот очищенный фрагмент клонировали в вектор для клонирования pCR2.1 с помощью набора для ТА-клонирования от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя. Плазмиду переносили в химически компетентные клетки E.coli One Shot TOP10 (которые поставляются вместе с набором). Выращивали жидкую культуру, из которой выделяли плазмиду набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit от Fermentas в соответствии с протоколом производителя, и вставку в плазмиде секвенировали. На фиг.1 показана эта последовательность и положения всех праймеров.

Полноразмерную кодирующую последовательность амплифицировали из плазмиды праймерами E6TopoF и E6TopoR с помощью Taq-полимеразы Phusion, как описано выше. ПЦР-фрагмент выделяли из геля, как описано выше. Полноразмерную кДНК клонировали в вектор pET TOPO с помощью набора реагентов Champion pET200 Directional TOPO Expression Kit от Invitrogen, как описано в протоколе производителя. Карта экспрессирующего вектора изображена на фиг.2.

Затем плазмиду переносили в химически компетентные клетки E.coli One Shot TOP10, которые поставляются вместе с набором реагентов. Плазмиду выделяли и секвенировали. Последовательность была идентична первой полноразмерной кДНК, секвенированной в векторе для клонирования pCR2.1. Кодирующая последовательность SISST3, представленная в SEQ ID No:1. SEQ ID No:2, демонстрирует установленную аминокислотную последовательность.

#### Экспрессия белка SISST3 в E.coli

Плазмиду pET200, содержащую SISST3, трансформировали в химически компетентные клетки E.coli BL21 Star (DE3) One Shot. Жидкие культуры выращивали в течение ночи при 37°C. На следующий день 50 мл культуру инокулировали 2,5 мл ночной культуры и выращивали до оптической плотности 0,5 при 600 нм. Культуру переносили в комнатную температуру и индуцировали изопропил бета-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) от Roche (Базель, Швейцария) в конечной концентрации 1 мМ. В качестве отрицательного контроля использовали культуру с фиктивной вставкой в вектор pET200 (R2R3-тип MYB-транскрипционный фактор (номер доступа в Genbank AY705977) без активности терпен-синтазы). Также брали неиндуцированные контроли обеих культур. Через 3 часа индукции, две аликвоты по 1 мл брали из каждой культуры, после чего оставшиеся клетки собирали центрифугированием при 4°C при 2000 об/мин в течение 15 минут а затем аспирировали среду. Клеточные осадки замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до осуществления ферментных анализов.

Оптическую плотность 1 мл аликвот определяли при 600 нм. Клетки собирали центрифугированием при 2000 об/мин при 4°C в течение 10 минут и аспирировали среду. Клетки одной индуцированной и одной неиндуцированной аликвоты ресуспендировали в 50 мкл на единицу OD буфера для терпен-синтазы (как описано в публикации Van Schie et al. Plant Mol Biol. 2007 Jun;64(3):251-63). После разрушения клеток инкубацией с помощью 1 мкг лизозима на льду в течение 30 минут и обработки ультразвуком, фракцию растворимого белка собирали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 30 минут при 4°C. Другие индуцированные и неиндуцированные клеточные осадки ресуспендировали в 50 мкл на единицу OD буфера PBST (0,8% NaCl (масс./об.), 0,02% KCl (масс./об.), 0,144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (масс./об.), 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (масс./об.) и 0,02% (об./об.) Tween-20). К фракциям общего и растворимого белка добавляли одну треть 4x буфера для образцов (8% SDS (масс./об.), 40% глицерин (масс./об.), 20% бета-

меркаптоэтанол (об./об.) 240 мМ Трис-НСl рН 6,8 и 0,08% бром-фенол синий (масс./об.), и образцы помещали в кипящую воду на 5 минут. 15 мкл образца белка разгоняли на электрофорезе на 10% акриламидном геле. Акриламидный гель суммарного белка из индуцированных и неиндуцированных клеток с плазмидой, содержащей SISST3 и транскрипционный фактор MYB, окрашивали кумасси бриллиантовым голубым (0,25% СВВ (масс./об.), 30% метанол (об./об.) и 10% уксусная кислота). Скан этого окрашенного геля показан на фиг.3.

Фракции суммарного и растворимых белков индуцированных и неиндуцированных клеток с плазмидой, содержащей SISST3, разгоняли на 10% акриламидном геле. После электрофореза образцов белки переносили на нитроцеллюлозу. Блот блокировали 5% раствором порошкового молока в PBST в течение часа. В течение ночи блот инкубировали в 10 мл PBST с 5% порошковым молоком с пента-His-антителом (номер по каталогу 34660, номер партии 130167450) от QIAGEN. Блот отмывали 3 раза PBST и последовательно инкубировали в течение одного часа в PBST с 5% (масс./об.) порошкового молока и пероксидазой хрена, связанной с анти-мышинным IGG антителом козы от Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США, после чего промывали 3 раза в PBST. Активность пероксидазы детектировали усиленной хемилюминисценцией (Amersham, Бакингемшир, Великобритания). Рисунок хемилюминисценции можно увидеть на фиг.4.

#### Функциональный анализ белка SISST3

В клеточных осадках оставшихся культур анализировали активность сесквитерпен-синтазы. Анализы сесквитерпен-синтазы проводили, как описано в публикации Van Schie et al. Plant Mol Biol. 2007 Jun;64(3):251-63, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Анализ продуктов реакции проводили с помощью Ni-очищенного белка на GC-MS TOF с колонкой DB-5, как описано Van Schie et al. Plant Mol Biol. 2007 Jun;64(3):251-63, или как описано в публикации Ament et al (2004) Plant Physiol. 135:2025-2037, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

На фиг.5 продемонстрированы спектры GC-MS иона 69 для Ni-очищенных белков транскрипционных факторов SISST3 и Myb, проанализированных с помощью FPP увеличенного в времени удерживания с 402 секунд до 436 секунд. Продукты пиков 1, 2, 3 и 4 были идентифицированы как (E)-бета-фарнезен (пик 1) (Z,E)-альфа-фарнезен (пик 2), (E,E)-альфа-фарнезен и (Z,Z)-альфа-фарнезен (оба в пике 3) и (E)-неролидол (пик 4), с помощью подлинных стандартов и сравнение ионных спектров и времен удержания.

На фиг.7 продемонстрирована хроматограмма GC-МС белковых экстрактов из клеток E.coli, экспрессирующих фарнезен-синтазу томата, которую анализировали с помощью FPP. Пик 1. бета-элемент (\*). 2. (E)-бета-фарнезен. 3. неизвестный сесквитерпен (\*). 4. (Z,E)-альфа-фарнезен. 5. (+)-валенсен (\*). 6. (E,E)-альфа-фарнезен. 7. неизвестный сесквитерпен (\*). (\*). Пики, отмеченные (\*), определены на основе масс-спектров, все другие основаны на масс-спектрах и сравнении времени удержания чистых стандартов.

Чистый (E)-бета-фарнезен был любезно предоставлен проф. Dr. W. Boland. Масс-спектры этого сесквитерпена и пика 1 масс-спектра продемонстрированы на фиг.6a. Смесь (Z,E)-альфа-фарнезена и (E,E)-альфа-фарнезена была приобретена у Sigma. Масс-спектры (Z,E)-альфа-фарнезена и пика 2 продемонстрированы на фиг.6b, а на фиг.6c продемонстрированы масс-спектры (E,E)-альфа-фарнезена и пика 3. (E) Неролидол приобретали у Sigma. Масс-спектры этого сесквитерпена и пика 4 продемонстрированы на фиг.6d.

Эти результаты демонстрируют что SISST3, клонированный из кДНК трихомы

томата, кодирует фарнезен-синтазу, обладающую (преимущественно) активностью бета-фарнезен-синтазы и, кроме того, активностью альфа-фарнезена.

Относительные уровни экспрессии фарнезен-синтазы томатов в различных тканях и органах

5 На фиг.8 продемонстрирована пространственная экспрессия фарнезен-синтазы (в соответствии с изобретением) в *Solanum lycopersicum*, как определено количественным ОТ-ПЦР и скорректировано для постоянной экспрессии RCE1 на кДНК из различных тканей *Solanum lycopersicum*. Столбчатые гистограммы представляют среднее двух независимых предикатов. Максимум указан планками погрешностей. кДНК  
10 синтезируются из РНК, выделенной из следующего: 1. Корни, 2. Цветочные почки, 3. Тычинки, 4. Лепестки, 5. Чашелистики, 6. Незрелые зеленые плоды, 7. Измельченные плоды, 8. Перезревшие плоды, 9. Красные плоды, 10. Черешки, 11. Стебли, 12. Растительные вершины, 13. Молодые листья, 14. Зрелые листья, 15. Стареющие листья.

#### 15 Формула изобретения

1. Выделенный полинуклеотид, соответствующий SEQ ID NO:1, или полинуклеотид, который имеет, по меньшей мере, 70% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, где полинуклеотид кодирует полипептид с активностью фарнезен-синтазы.

20 2. Полинуклеотид по п.1, где полинуклеотид кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы.

3. Полинуклеотид по п.1, где полинуклеотид кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы.

4. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, соответствующий SEQ ID  
25 NO:2, или полипептид, который имеет, по меньшей мере, 70% идентичность с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2, где полинуклеотид кодирует полипептид с активностью фарнезен-синтазы.

5. Фрагмент полинуклеотида по любому из предыдущих пунктов, где фрагмент кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-  
30 фарнезен-синтазы, предпочтительно, где фрагмент кодирует полипептид с активностью альфа-фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы.

6. Полипептид, соответствующий SEQ ID NO:2, или полипептид, имеющий, по меньшей мере, 70% идентичность с аминокислотной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:2, где полипептид имеет активность фарнезен-синтазы.

7. Полипептид по п.6, где полипептид обладает активностью альфа-фарнезен-синтазы и/или активностью бета-фарнезен-синтазы, более предпочтительно, активностью альфа-  
35 фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы.

8. Фрагмент полипептида по любому из пп.6-7, где фрагмент обладает активностью альфа-фарнезен-синтазы и активностью бета-фарнезен-синтазы.

9. Генетическая конструкция, содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-5, где генетической конструкцией является трансформационный вектор или экспрессионный  
40 вектор.

10. Генетическая конструкция, содержащая в направлении 5'-3' полинуклеотид с открытой рамкой считывания, кодирующий полипептид по любому из пп.6-8, где генетической конструкцией является трансформационный вектор или экспрессионный  
45 вектор.

11. Генетическая конструкция, содержащая в направлении 5'-3' полинуклеотид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим полипептид по любому из

пп.6-8, где генетической конструкцией является трансформационный вектор.

12. Клетка-хозяин для экспрессии фарнезен-синтазы, содержащая генетическую конструкцию по любому из пп.9-11.

13. Трансгенная растительная клетка для экспрессии фарнезен-синтазы, содержащая генетическую конструкцию по любому из пп.9-11.

14. Способ получения альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена, включающий стадии культивирования клетки, которая была генетически модифицирована с помощью полинуклеотида по любому из пп.1-5 с получением повышенной активности альфа-фарнезен-синтазы и/или активности бета-фарнезен-синтазы; и необязательно получения клетки с фарнезилдифосфатом; и выделения полученных альфа-фарнезена и/или бета-фарнезена.

15. Способ модулирования продуцирования растением альфа-фарнезена и бета-фарнезена, включающий повышение или уменьшение экспрессии фарнезен-синтазы, имеющей полипептидную последовательность, определенную по любому из пп.6-8, где указанного повышения или уменьшения достигают с помощью генетической модификации для изменения экспрессии полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид, где указанная модификация осуществляется путем введения трансформационного вектора или экспрессионного вектора в растение.

16. Применение полинуклеотида, соответствующего SEQ ID NO:1, или полинуклеотида, который имеет, по меньшей мере, 70% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1, для картирования молекулярного (ДНК) маркера, связанного с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1 или полинуклеотидом, который имеет, по меньшей мере, 70% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:1.

25

30

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Keygene  
 <120> ФАРНЕЗЕН-СИНТАЗА  
 <130> P29486PC00  
 <150> US61/120.179  
 <151> 2008-12-05  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 1665  
 <212> ДНК  
 <213> Solanum lycopersicon  
 <400> 1  
 atggagttgt gcacacaaac cgttgcagcg gatcatgaag ttataattac acgtcgctct 60  
 ggtagtcac atcctacttt atggggtgac cattttcttg cctatgctga tcttcgggga 120  
 gccaatgaag ggaagagaa gcaaaatgaa gacctaaaag aagaagtgag aaagatgcta 180  
 gtgatggctc cttcaaagtc tttggaaaaa cttgaactca tcaacacaat ccaatgtctt 240  
 ggtttagggt atcattttca aagtgagatt gatgaatcat tgagttacat gtacactcat 300  
 tatgaagaat attcgattgg tgatcttcat gctattgctc tatgctttcg attacttagg 360  
 caacaagggt attatgtctc atgtgatgca ttttaagaagt tcaactaatga ccaaggaaat 420  
 ttcaaggaag aattggtaa ggatgtagaa ggaatgttga gcttatatga ggcagcacia 480  
 ttcagagtac atggagaaca aattcttgat gaagcactaa atttcacat tgctcaattg 540  
 aaacaaattt tgcctaaatt gagcaactcc caacttgac aacaaatcac aaatgcactc 600  
 aagtatcaa ttaaagatgg cattgtgagg gtagaaaca gaaaatacat atcattttac 660  
 caacaaaatc aaaatcacia tgaagtctta ctaaactttg ccaaattaga cttcaacatc 720  
 ttgcaaacat tgcataaaaa ggagctatct gatatgacaa ggtgggtggaa aaagatggaa 780  
 ctagtgaaca cattacctta tgcaagagac agattggtag agtggtactt ttgggtgtta 840  
 ggcacctatt ttgagcctca gtatagcgtc gcaaggaaaa tgttgacaaa aatttcattc 900  
 tatatttcaa ttattgatga cacatatgat atttatggga aactagatga acttactcta 960  
 ttactcagg caattgaaag gtggaatatt gatgcttcag aacagttacc attatatatg 1020  
 aagattatth accgtgatct tttagatggt tatgatgaaa ttgagaaaga gttggcaaat 1080  
 gaaaacaagt catttttagt caattattcc ataaatgaga tgaaaaaggt cgtaaggggt 1140  
 tactttcaag aggcaaaatg gtattatgga aagaaagtac caacaatgga gcaatatatg 1200  
 aagaatggaa tttcaacaag tgcttacata ttgctaaca ctacttcttg gttagcaatg 1260  
 gaaatgtag caactaaaga tgcatttgat tgggtagcaa ctgaaccacc aatagttggt 1320

gcttcttggt acattataag attactcaat gatcttgat cacatgagga agaacaaaaa 1380  
 cgaggaaatg cggcttctgc tgttgaatgt tatatgaatg aatatagcgt taaaaaggaa 1440  
 gaagcacaca taaaaataag agatataata gaaaattatt ggaaggattt gaatgaagaa 1500  
 tactttaaag tagatatgat tattatacca agagttttgc tcatgtgat aattaatctt 1560  
 acaagagtgg ctgagttcat atataaagat gaagatgctt atactttctc caaaaataac 1620  
 ttgaaagatg tcatctctga tatactagtt gatcctatta tatag 1665

<210> 2  
 <211> 554  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Solanum lycopersicon

<400> 2

Met Glu Leu Cys Thr Gln Thr Val Ala Ala Asp His Glu Val Ile Ile  
 1 5 10 15

Thr Arg Arg Ser Gly Ser His His Pro Thr Leu Trp Gly Asp His Phe  
 20 25 30

Leu Ala Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Ala Asn Glu Gly Glu Glu Lys Gln  
 35 40 45

Asn Glu Asp Leu Lys Glu Glu Val Arg Lys Met Leu Val Met Ala Pro  
 50 55 60

Ser Lys Ser Leu Glu Lys Leu Glu Leu Ile Asn Thr Ile Gln Cys Leu  
 65 70 75 80

Gly Leu Gly Tyr His Phe Gln Ser Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ser Tyr  
 85 90 95

Met Tyr Thr His Tyr Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Asp Leu His Ala Ile  
 100 105 110

Ala Leu Cys Phe Arg Leu Leu Arg Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Ser Cys  
 115 120 125

Asp Ala Phe Lys Lys Phe Thr Asn Asp Gln Gly Asn Phe Lys Glu Glu  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Val Glu Gly Met Leu Ser Leu Tyr Glu Ala Ala Gln  
 145 150 155 160

Phe Arg Val His Gly Glu Gln Ile Leu Asp Glu Ala Leu Asn Phe Thr  
 165 170 175

RU 2546877 C2

Ile Ala Gln Leu Lys Gln Ile Leu Pro Lys Leu Ser Asn Ser Gln Leu  
180 185 190

Ala Gln Gln Ile Thr Asn Ala Leu Lys Tyr Pro Ile Lys Asp Gly Ile  
195 200 205

Val Arg Val Glu Thr Arg Lys Tyr Ile Ser Phe Tyr Gln Gln Asn Gln  
210 215 220

Asn His Asn Glu Val Leu Leu Asn Phe Ala Lys Leu Asp Phe Asn Ile  
225 230 235 240

Leu Gln Thr Leu His Lys Lys Glu Leu Ser Asp Met Thr Arg Trp Trp  
245 250 255

Lys Lys Met Glu Leu Val Asn Thr Leu Pro Tyr Ala Arg Asp Arg Leu  
260 265 270

Val Glu Cys Tyr Phe Trp Cys Leu Gly Thr Tyr Phe Glu Pro Gln Tyr  
275 280 285

Ser Val Ala Arg Lys Met Leu Thr Lys Ile Ser Phe Tyr Ile Ser Ile  
290 295 300

Ile Asp Asp Thr Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Leu Asp Glu Leu Thr Leu  
305 310 315 320

Phe Thr Gln Ala Ile Glu Arg Trp Asn Ile Asp Ala Ser Glu Gln Leu  
325 330 335

Pro Leu Tyr Met Lys Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Leu Asp Val Tyr Asp  
340 345 350

Glu Ile Glu Lys Glu Leu Ala Asn Glu Asn Lys Ser Phe Leu Val Asn  
355 360 365

Tyr Ser Ile Asn Glu Met Lys Lys Val Val Arg Gly Tyr Phe Gln Glu  
370 375 380

Ala Lys Trp Tyr Tyr Gly Lys Lys Val Pro Thr Met Glu Gln Tyr Met  
385 390 395 400

Lys Asn Gly Ile Ser Thr Ser Ala Tyr Ile Leu Leu Thr Thr Thr Ser  
405 410 415

Trp Leu Ala Met Gly Asn Val Ala Thr Lys Asp Ala Phe Asp Trp Val  
420 425 430

RU 2546877 C2

Ala Thr Glu Pro Pro Ile Val Val Ala Ser Cys Tyr Ile Ile Arg Leu  
 435 440 445

Leu Asn Asp Leu Val Ser His Glu Glu Glu Gln Lys Arg Gly Asn Ala  
 450 455 460

Ala Ser Ala Val Glu Cys Tyr Met Asn Glu Tyr Ser Val Thr Lys Glu  
 465 470 475 480

Glu Ala His Ile Lys Ile Arg Asp Ile Ile Glu Asn Tyr Trp Lys Asp  
 485 490 495

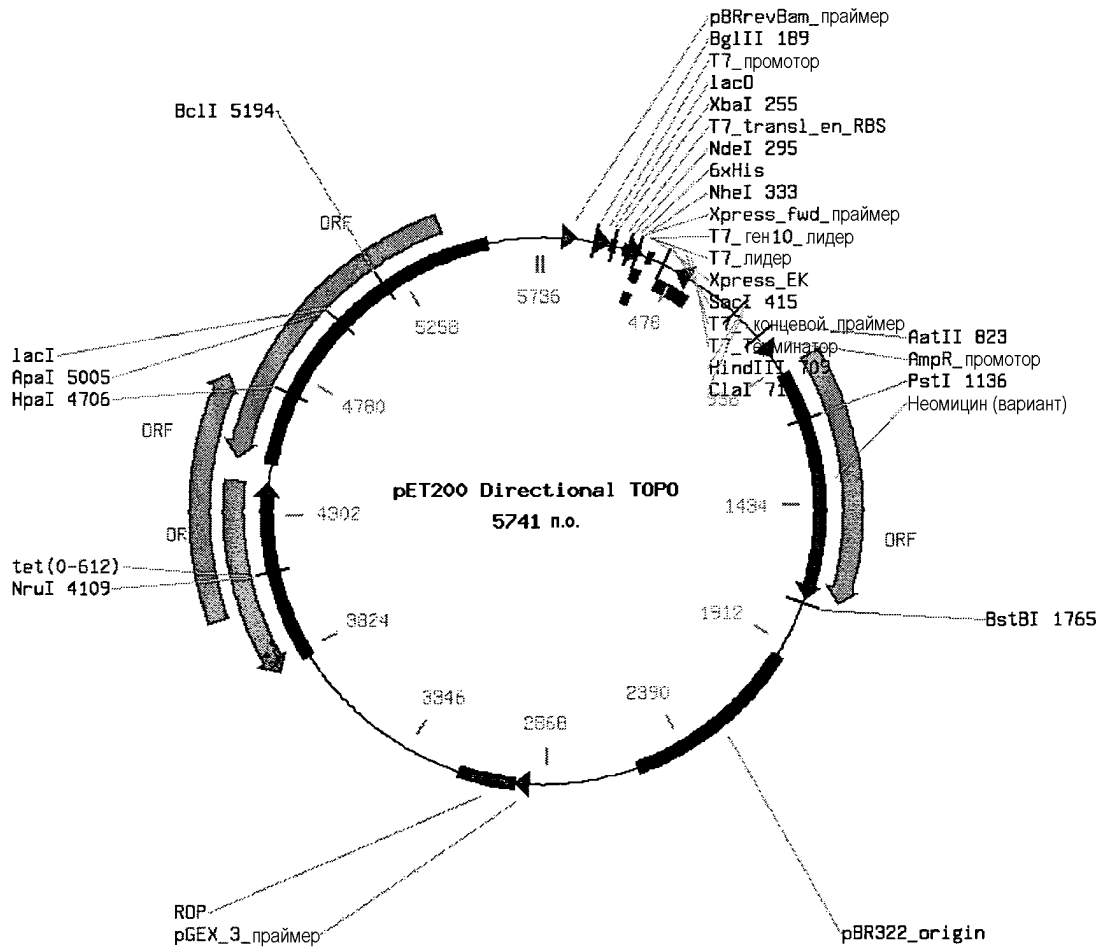
Leu Asn Glu Glu Tyr Phe Lys Val Asp Met Ile Ile Ile Pro Arg Val  
 500 505 510

Leu Leu Met Cys Ile Ile Asn Leu Thr Arg Val Ala Glu Phe Ile Tyr  
 515 520 525

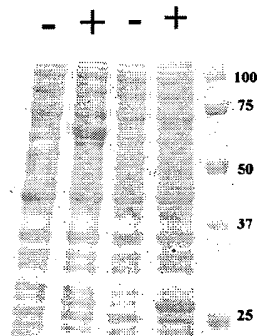
Lys Asp Glu Asp Ala Tyr Thr Phe Ser Lys Asn Asn Leu Lys Asp Val  
 530 535 540

Ile Ser Asp Ile Leu Val Asp Pro Ile Ile  
 545 550



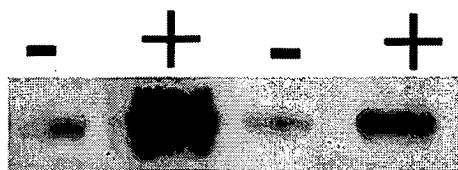


**ФИГ.2**  
**Е6 МУВ**

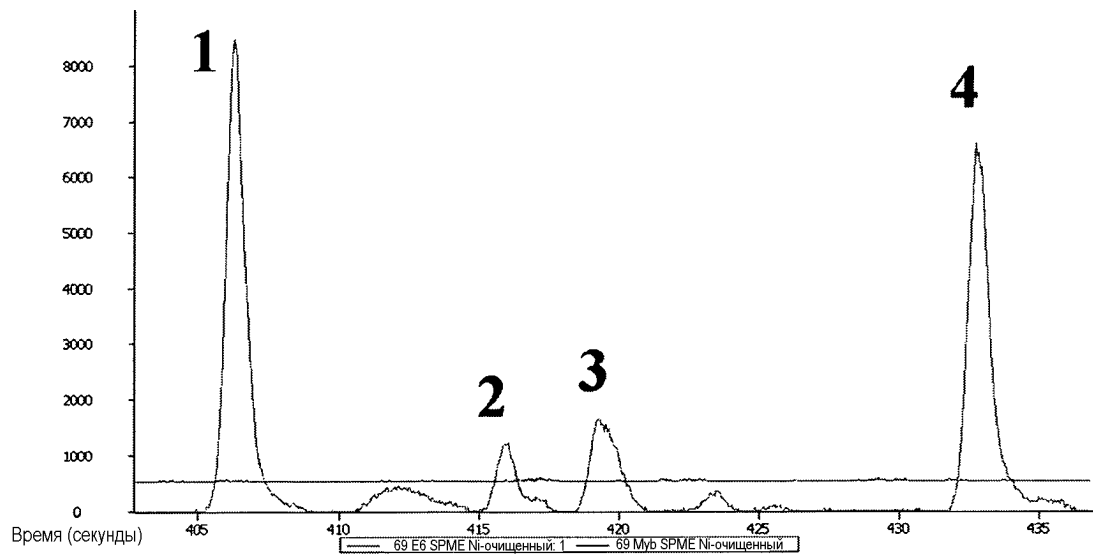


**ФИГ.3**

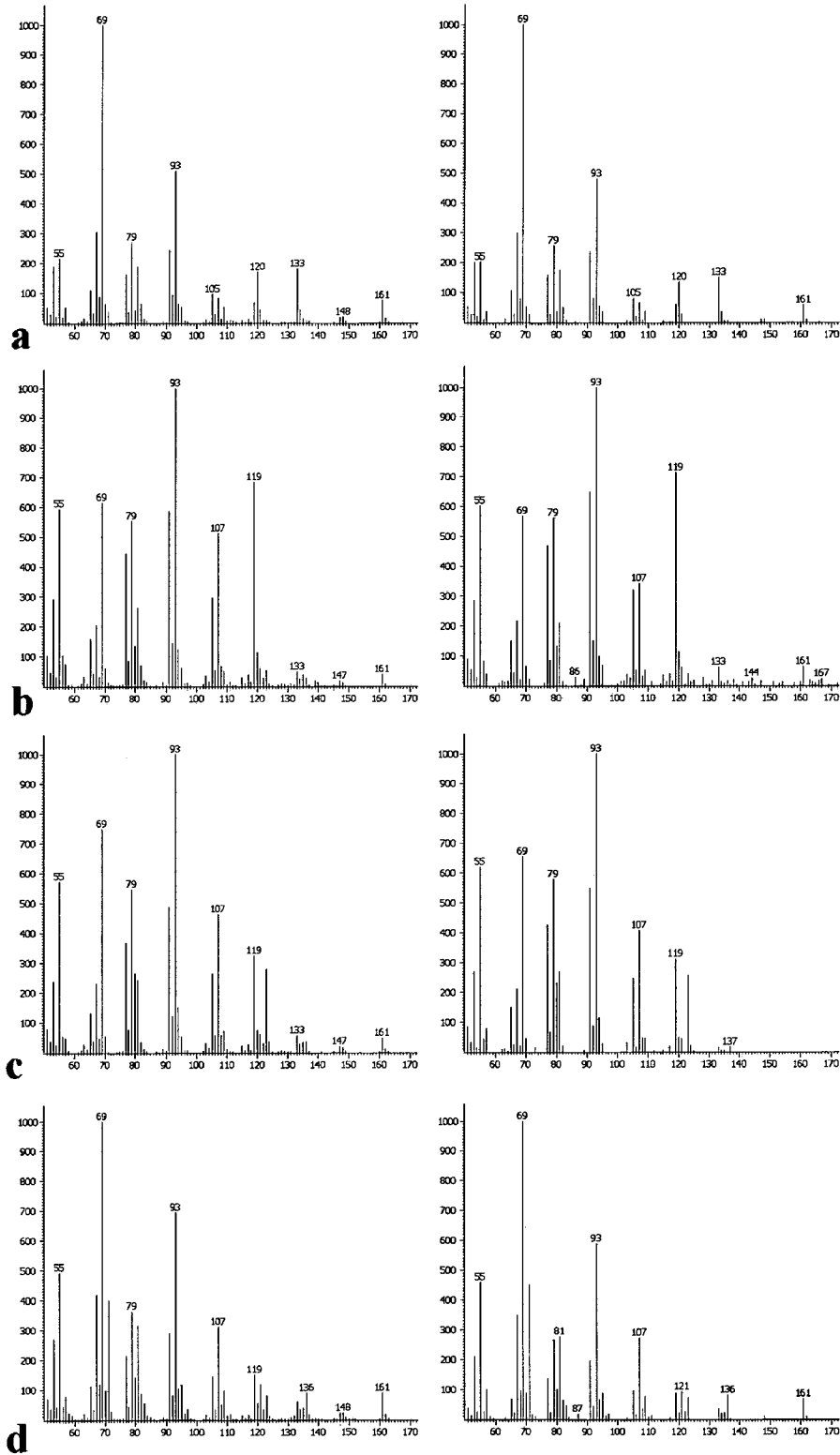
**Суммарный Растворимый**



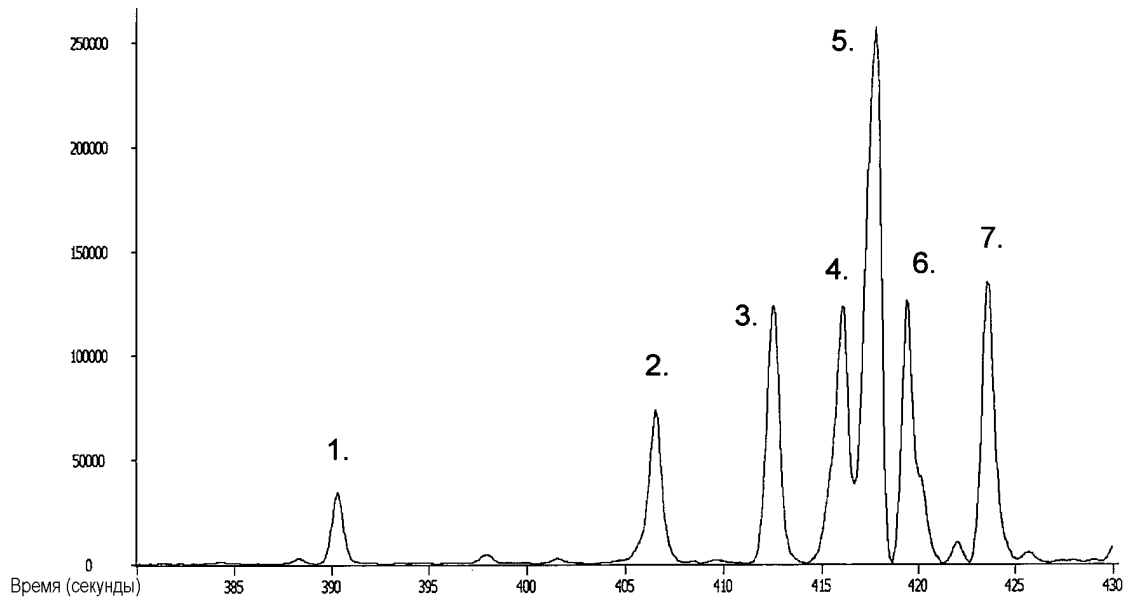
**ФИГ.4**



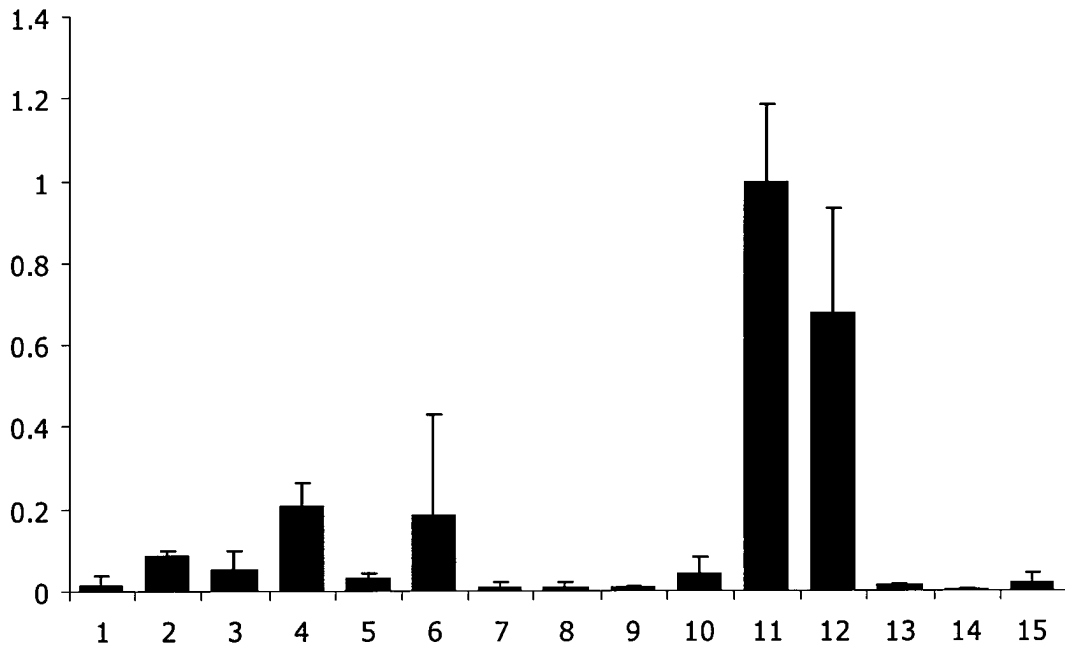
ФИГ.5



ФИГ.6



**ФИГ.7**



**ФИГ.8**