



(19) **UA** (11) **71 536** (13) **C2**  
(51)МПК <sup>7</sup> **C 12N 15/53, 9/02, 15/82**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97010166, 08.06.1995  
(24) Дата начала действия патента: 15.12.2004  
(30) Приоритет: 16.06.1994 US 08/261,198  
(46) Дата публикации: 15.12.2004  
(86) Заявка РСТ:  
РСТ/IV95/00452, 19950608

(72) Изобретатель:  
Уорд Эрик Рассел, US,  
Волрат Сандра, US  
(73) Патентовладелец:  
СИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ, СН

(54) ВЫДЕЛЕННАЯ МОЛЕКУЛА ДНК, КОТОРАЯ КОДИРУЕТ ПРОТОПОРФИРИНОГЕНОКСИДАЗУ, ЕЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к молекулам ДНК, которые кодируют нативные или модифицированные формы фермента протопорфириногенаоксидазы (протокса), которые обладают толерантностью к гербицидам; представлены экспрессионная кассета, рекомбинантный вектор, клетка-хозяин, растительная клетка, содержащие указанные молекулы. Также изобретение относится к растениям, обладающим измененной активностью протокса, которая обуславливает толерантность к гербицидам, это может быть достигнуто с помощью мутации нативного гена протокса или с

помощью увеличения уровней экспрессии нативного гена; способов получения этих растений, способов борьбы с ростом нежелательной растительности и применения последовательностей согласно изобретению для получения устойчивых к гербицидам растений.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2004, N 12, 15.12.2004. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2



(19) **UA** (11) **71 536** (13) **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12N 15/53, 9/02, 15/82**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

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

(21), (22) Application: 97010166, 08.06.1995  
(24) Effective date for property rights: 15.12.2004  
(30) Priority: 16.06.1994 US 08/261,198  
(46) Publication date: 15.12.2004  
(86) PCT application:  
PCT/IB95/00452, 19950608

(72) Inventor:  
Ward Eric Russell, US,  
Volrath Sandra, US  
(73) Proprietor:  
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, CH

(54) **ISOLATED DNA MOLECULE CODING protoporphyrinogen oxidase, MODIFIED VARIANTS THEREOF AND A METHOD FOR USE THEREOF**

(57) Abstract:

The present invention provides novel eukaryotic DNA sequences coding for native protoporphyrinogen oxidase (protox) or modified forms of the enzyme which are herbicide tolerant. Plants having altered protox activity which confers tolerance to herbicides are also provided. These plants may be bred or engineered for resistance to protox inhibitors *via* mutation of the native protox gene to a resistant form or through increased levels of expression of the native protox gene, or they may be transformed with modified eukaryotic or prokaryotic protox

coding sequences or wild type prokaryotic protox sequences which are herbicide tolerant. Plant genes encoding wild-type and altered protox, purified plant protox, methods of isolating protox from plants, and methods of using protox-encoding genes are also disclosed.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2004, N 12, 15.12.2004. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2



(19) **UA** <sup>(11)</sup> **71 536** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51)МПК <sup>7</sup> **C 12N 15/53, 9/02, 15/82**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
97010166, 08.06.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.12.2004

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 16.06.1994 US 08/261,198

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.12.2004

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:  
PCT/IV95/00452, 19950608

(72) Винахідник(и):  
Уорд Ерік Рассел , US,  
Волрат Сандра , US

(73) Власник(и):  
СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ, СН

(54) ВИДІЛЕНА МОЛЕКУЛА ДНК, ЯКА КОДУЄ ПРОТОПОРФІРИНОГЕНОКСИДАЗУ, ЇЇ МОДИФІКОВАНІ ВАРІАНТИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід відноситься до молекул ДНК, що кодують нативні або модифіковані форми ферменту протопорфіриногенаоксидази (протокса), що мають толерантність до гербіцидів; представлені експресійна касета, рекомбінантний вектор, клітка-хазяїн, рослинна клітка, що містять зазначені молекули. Також винахід відноситься до рослин, що володіють зміненою

активністю протоксу, що обумовлює толерантність до гербіцидів, це може бути досягнуте за допомогою мутації нативного гена протоксу або за допомогою збільшення рівнів експресії нативного гена; способів одержання цих рослин, способів боротьби з ростом небажаної рослинності і застосування послідовностей відповідно до винаходу для одержання стійких до гербіцидів рослин.

U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2

## Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к манипулированию ферментативной активностью, ответственной за превращение протопорфириногена IX в протопорфирин IX в процессе биосинтеза, общего для всех эукариот. Один из предметов изобретения относится к развитию устойчивости к гербицидам у растений, тканей растений и семян. Другой предмет изобретения относится к разработке методов диагностики и лечения дефицита этой ферментативной активности у животных, в частности у людей.

Процессы биосинтеза, приводящие к производству хлорофилла и гема, включают ряд общих стадий. Хлорофилл представляет собой поглощающий свет пигмент, присутствующий во всех зеленых фотосинтезирующих организмах. Гем представляет собой кофактор гемоглобина, цитохромов, P450-оксигеназ со смешанной функцией, пероксидаз и каталаз (см., например, у Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers, New York (1975)) и, следовательно, является необходимым компонентом всех аэробных организмов.

Последней общей стадией биосинтеза хлорофилла и гема является окисление протопорфириногена IX в протопорфирин IX. Протопорфириноген-оксидаза (обозначенная в данном описании как "протоке") представляет собой фермент, который катализирует эту последнюю стадию окисления (Matringe и др., Biochem. J. 260: 231 (1989)).

Фермент протоке был очищен полностью или частично из многочисленных организмов, включающих дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Labbe-Bois и Labbe, Biosynthesis of Heme and Chlorophyll, E.H.Dailey, ред. McGraw Hill: New York, стр.235-285 (1990)), этиопласты ячменя (Jacobs и Jacobs, Biochem.J. 244: 219 (1987)) и печень мыши (Dailey и Karr, Biochem. 26: 2697 (1987)). Гены, кодирующие протоке, были выделены из двух прокариот: *Escherichia coli* (Sasarman и др., Can. J.Microbiol. 39: 1155 (1993)) и *Bacillus subtilis* (Dailey и др., J.Biol. Chem. 269: 813 (1994)). Эти гены не обладают сходной последовательностью; кодируемые ими протеиновые продукты не имеют каких-либо идентичных аминокислотных последовательностей. Протеин *E.coli* имеет массу приблизительно 21кДа и связан с клеточной мембраной. Протеин *B.subtilis* имеет массу 51кДа и является растворимым, активным в цитоплазме.

В настоящее время слишком мало известно о ферменте протоксе, чтобы получить возможность выделить кодирующие протоке гены из высших эукариот (т.е. животных, растений и всех других многоклеточных, имеющих ядро организмов, отличных от низших эукариотических микроорганизмов, таких, как дрожжи, одноклеточные водоросли, простейшие и т.д.), используя известные подходы.

В частности многие стандартные методы выделения новых протеинов и генов базируются на предположении, что они обладают значительным сходством по первичной структуре (т.е. по аминокислотной последовательности и последовательности ДНК) с известными протеинами и генами, обладающими аналогичной функцией. Такие стандартные методы включают гибридизацию нуклеиновых кислот и амплификацию путем полимеразно-цепевой реакции с использованием олигонуклеотидных праймеров, соответствующих мотивам консервативной аминокислотной последовательности. Не следует ожидать, что эти методы будут пригодны для выделения генов протокса эукариот при использовании современной информации о структуре, которая ограничена данными о генах протокса прокариот, поскольку не существует значительного структурного сходства даже между известными генами и протеинами протокса прокариот.

Другой подход, который был применен для выделения генов биосинтеза в других метаболических процессах из высших эукариот, представляет собой комплементацию в микробных мутантах дефицита представляющей интерес активности. Для этого подхода библиотеку кДНК из высших эукариот клонируют в векторе, который может управлять экспрессией кДНК в хозяине-микроорганизме. Затем вектор трансформируют или каким-либо иным образом вводят в мутантный микроорганизм и отбирают колонии, которые фенотипически больше не являются мутантами.

Эту стратегию применяли для выделения генов из высших эукариот, вовлеченных в несколько метаболических процессов, включая биосинтез гистидина (см., например, патент США 5290926 и WO 94/026909 на имя Ward и др., полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылки), биосинтез лизина (см., например, Frish и др., Mol. Gen. Genet. 228: 287 (1991)), биосинтез пурина (см., например, Aimi и др., J.Biol. Chem. 265: 9011 (1990)) и биосинтез триптофана (см., например, Niyogi и др., Plant Cell 5: 1011 (1993)). Однако, несмотря на доступность микробных мутантов, у которых, вероятно, недостаточна активность протокса (например, *E.coli* (Sasarman и др., J.Gen. Microbiol. 113: 297 (1979)), *Salmonella typhimurium* (Xu и др., J.Bacteriol. 174: 3953 (1992)) и *Saccharomyces cerevisiae* (Camadro и др., Biochem. Biophys. Res. Comm. 106: 724 (1982)), применение этого метода для выделения кДНК, кодирующих ферментативную активность протокса у эукариот, на основе доступной информации в основном непредсказуема.

Для этого есть несколько причин. Во-первых, последовательность кДНК протокса эукариот может не экспрессироваться с адекватными уровнями в мутантных микроорганизмах, например, вследствие применения кодона, несовместимого с обычно предпочтительными кодонами для хозяина-микроорганизма. Во-вторых, первичный продукт трансляции из клонированной кодирующей последовательности эукариот может не производить функциональный полипептид, например, если для пост-трансляционной модификации, такой, как гликозилирование, необходима активность, которой микроорганизм не обладает. В-третьих, протеин эукариот может оказаться неспособным принимать свою активную конформацию в хозяине-микроорганизме, например, если протеин в норме ориентирован к мембранной системе конкретной органеллы, которой микробный хозяин лишен. Эта последняя возможность особенно вероятна для фермента протокса растений, который связан в клетке растения с органеллами, отсутствующим у микробных хозяев, применяемых в методе комплементации. В

частности фермент протеке растений связан как с оболочкой хлоропласта, так и с тилакоидными мембранами (Matringe и др., J.Biol. Chem. 267: 4646 (1992)) и, вероятно, достигает указанных мембранных систем в результате пост-трансляционного механизма ориентации, включающего как N-концевую транзитную последовательность, так и внутренние свойства зрелого полипептида (см., например, у Kohorn и Tobin, Plant Cell 1: 159 (1989); Li и др., Plant Cell 3: 709 (1991); Li и др., J.Biol. Chem. 267: 18999 (1992)).

Известно, что фермент протеке играет определенную роль при некоторых болезненных состояниях человека. Пациенты, страдающие от смешанной порфирии, аутосомного доминантного расстройства, характеризующегося как нейropsychическими симптомами, так и повреждениями кожи, имеют пониженные уровни активности протокса (Brenner и Bloomer, New Engl. J.Med. 302: 765 (1980)). Вследствие отсутствия данных о ферменте протоксе человека и соответствующем ему гене возможности для диагностики и лечения этого расстройства в настоящее время весьма ограничены.

Применение гербицидов для борьбы с нежелательной растительностью, такой, как сорняки или растения в сельскохозяйственных культурах, стало почти повсеместной практикой. Соответствующий рынок превышает миллиард долларов ежегодно. Несмотря на такое широкое применение, борьба с сорняками остается для фермеров важной и дорогой проблемой.

Для эффективного применения гербицидов необходим достаточно жесткий контроль. Например, время и способ обработки и стадия развития сорного растения являются важным фактором для получения хороших результатов при борьбе с сорняками с помощью гербицидов. Поскольку различные виды сорняков устойчивы к гербицидам, важность получения эффективных гербицидов существенно возрастает.

К сожалению, гербициды, проявляющие более высокую эффективность, предназначенные для более широкого спектра сорняков и обладающие ускоренным разложением в почве, могут также обладать большей фитотоксичностью для культурных растений. Одним из решений этой проблемы была разработка культурных растений, устойчивых или толерантных к гербицидам. Гибриды или сорта культурных растений, устойчивые к гербицидам, позволяют применять гербициды без сопутствующего риска повредить культурное растение. Развитие устойчивости может дать возможность обрабатывать гербицидом культурное растение, где его применение ранее было исключено или ограничено (например, применение для предвсходовой обработки) вследствие чувствительности полезных растений к гербициду. Например, патент США 4761373 на имя Anderson и др. относится к устойчивости растений к различным гербицидам из классов имидазолинона или сульфонида. Устойчивость обусловлена изменением фермента синтазы ацетооксикислоты (AHAS). В патенте США 4975374 на имя Goodman и др. описаны растительные клетки и растения, содержащие ген, кодирующий мутантную глутамин-синтазу (GS), устойчивую к ингибированию гербицидами, для которых известна способность ингибировать GS, например, к фосфинотрицину и к метионинсуль-фоксимины. В патенте США 5013659 на имя Bedbrook и др. описаны растения, экспрессирующие мутантную ацетолактат-синтазу, что делает растения устойчивыми к ингибированию гербицидами из класса сульфонилмочевины. В патенте США 5162602 на имя Somers и др. описаны растения, толерантные к ингибированию гербицидами циклогександионом и арилоксифеноксипропановой кислотой. Эта толерантность обусловлена изменением ацетил-СоА-карбоксилазы (АККазы).

Фермент протокс служит в качестве мишени для различных гербицидных соединений. Гербициды, которые ингибируют протеке, включают многие различные по структуре классы молекул (Duke и др., Weed Sci. 39: 465 (1991); Nandihalli и др., Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193 (1992); Matringe и др., FEBS Lett. 245: 35 (1989); Yanase и Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70 (1989)). Эти гербицидные соединения включают дифениловые эфиры [например, ацифлуорфен, 5-[2-хлор-4-(трифторметил)фенокси]-2-нитробензойная кислота; ее метиловый эфир; или оксифлуорфен, 2-хлор-1-(3-этокси-4-нитрофенокси)-4-(трифторбензол)], оксидиазолы (например, оксидиазон, 3-[2,4-дихлор-5-(1-метилэтокси)фенил]-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксадиазол-2-(3Н)-он), циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргалоксифенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид; хлорфталим, N-(4-хлорфенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид), фенилпиразолы (например, ТНПП-этил, этил-2-[1-(2,3,4-трихлорфенил)-4-нитропиразолил-5-окси]пропионат; M&B 39279), производные пиридина (например, LS 82-556) и фенопилат и его O-фенилпирролидино- и пиперидинкарбаматные аналоги. Многие из этих соединений конкурентно ингибируют нормальную реакцию, катализируемую ферментом, вероятно, выступая в качестве аналогов субстрата.

Вероятный механизм действия ингибирующих протеке гербицидов включает накопление в хлоропласте протопорфириногена IX. Это накопление, вероятно, приводит к проникновению протопорфириногена IX в цитозоль, где он окисляется с помощью пероксидазной активности в протопорфирин IX. При экспозиции светом протопорфирин IX может вызвать образование в цитозоле атомарного кислорода. Этот атомарный кислород в свою очередь может привести к образованию других реактивных видов кислорода, которые могут вызвать переокисление липидов и разрушение мембраны, что приводит к быстрой гибели клетки (Lee и др., Plant Physiol. 102: 881 (1993)).

Не все ферменты протоксы чувствительны к гербицидам, которые ингибируют ферменты протоксы растений. Ферменты протоксы, кодируемые генами, выделенными как из *Escherichia coli* (Sasarma и др., Can. J. Microbiol. 39: 1155 (1993)), так и из *Bacillus subtilis* (Dailey и др., J.Biol. Chem. 269: 813 (1994)), устойчивы к этим гербицидным ингибиторам. Кроме того, были описаны мутанты одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, устойчивые к фенилимидному гербициду S-23142 (Kataoka и др., J.Pesticide Sci. 15: 449 (1990); Shibata и др., Research in Photosynthesis, том III, N. Murata, ред. Kluwer: Netherlands, стр.567-570 (1992)). По крайней мере, один из этих мутантов, как полагают, имеет измененную активность

протокса, который устойчив не только к гербицидному ингибитору, по которому проходил отбор этого мутанта, но также и к другим классам ингибиторов протокса (Oshio и др., Z. Naturforsch. 48c: 339 (1993); Sato и др., ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, S. Duke, ред. ACS Press: Washington, D.C. (1994)). Также есть данные о том, что мутантная линия клеток табака обладает устойчивостью к ингибитору S-21432 (Che и др., Z. Naturforsch. 48c: 350 (1993)).

Настоящее изобретение относится к выделенной молекуле ДНК, кодирующей фермент протопорфириноген-оксидазу (протоке) из эукариота, который предпочтительно представляет собой высший эукариот. В частности настоящее изобретение относится к выделенным молекулам ДНК, кодирующим фермент протопорфириноген-оксидазу (протоке), источником которого является растение или человек.

В соответствии с изобретением предпочтительными являются выделенные молекулы ДНК, кодирующие фермент протопорфириноген-оксидазу (протоке) из двудольных растений, однако особенно предпочтительны таковые из растений р. Arabidopsis, такие, как представленные в последовательностях SEQ ID NO: 1, 3 и 9.

Также предпочтительными являются выделенные молекулы ДНК, кодирующие фермент протопорфириноген-оксидазу (протоке) из однодольных растений, и наиболее предпочтительно из растений кукурузы, такие, как представленные в последовательностях SEQ ID NO: 5 и 7. Особенно предпочтительной согласно изобретению является выделенная молекула ДНК, кодирующая протеин фермента протопорфириноген-оксидазы (протокса) из двудольных растений, где указанный протеин имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2, 4 и 10. Также предпочтительной является выделенная молекула ДНК, кодирующая протеин фермента протопорфириноген-оксидазы (протокса) из однодольных растений, где указанный протеин имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 6 и 8.

Используя информацию, предоставленную настоящим изобретением, кодирующая последовательность ДНК для фермента протопорфириноген-оксидазы (протокса) из любого эукариота может быть получена с использованием стандартных методов. Таким образом, еще один предмет настоящего изобретения относится к зондам, способным к специфичной гибридизации с эукариотической последовательностью ДНК, кодирующей протопорфириноген-оксидазную активность, или с соответствующей мРНК, и способам обнаружения указанных последовательностей ДНК в эукариотах с использованием зондов по изобретению.

Настоящее изобретение, кроме того, включает полигенные экспрессирующие кластеры и рекомбинантные векторы, содержащие эти полигенные экспрессирующие кластеры, которые главным образом содержат промотор, а именно, промотор, активный в растении, действенным образом сцепленный с молекулой ДНК, кодирующей фермент протопорфириноген-оксидазу (протоке) из эукариота по изобретению. Полигенный экспрессирующий кластер по изобретению может в дополнение к этому также включать сигнальную последовательность, действенным образом сцепленную с молекулой ДНК, причем эта сигнальная последовательность способна направлять протеин, кодируемый молекулой ДНК, в хлоропласт или в митохондрию.

Кроме того, настоящее изобретение относится к растениям, клеткам растений, тканям растений и семенам растений с измененной активностью протокса, которые устойчивы или, по крайней мере, толерантны к ингибированию концентрациями гербицида, которые в норме ингибируют естественную активность протокса в растении. В частности одними из вариантов осуществления изобретения являются растения, у которых измененная активность протокса обусловлена сверхэкспрессией фермента протокса дикого типа или экспрессией молекулы ДНК, кодирующей толерантный к гербициду фермент протоке. Этот толерантный к гербициду фермент протоке может представлять собой модифицированную форму фермента протокса, которая в естественных условиях встречается в эукариоте или прокариоте; или модифицированную форму фермента протокса, которая в естественных условиях встречается в растении; или толерантный к гербициду фермент протоке может в естественных условиях встречаться в прокариоте. Растения, подпадающие под объем настоящего изобретения, включают однодольные и двудольные растения, но, прежде всего гибридные растения. Предпочтительными являются такие растения, которые могут представлять собой потенциальные мишени для ингибирующих протоке гербицидов, в частности такие важные сельскохозяйственные культуры, как кукуруза и другие зерновые культуры, такие, как пшеница, овес, рожь, сорго, рис, ячмень, просо, густой травяной покров (дерн или газонные травы), кормовые травы и т.п., а также хлопчатник, табак, сахарный тростник, сахарная свекла, масличный рапс и соя.

Кроме того, настоящее изобретение включает материал для размножения растений в соответствии с изобретением, предпочтительно семена растений, обработанные защитным покрытием и, прежде всего защитным покрытием, содержащим препарат, выбранный из группы, состоящей из гербицидов, инсектицидов, фунгицидов, бактерицидов, нематоцидов, моллюскицидов или их смесей.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам получения растений, клеток растений, тканей растений и семян растений и их трансгенного потомства, которые содержат фермент протоке, устойчивый или толерантный к ингибированию гербицидом в концентрации, которая ингибирует естественную активность протокса. Эта устойчивость или толерантность может быть получена путем экспрессии в трансгенных растениях любой молекулы ДНК, которая кодирует модифицированную форму фермента протокса, которая в естественных условиях встречается в эукариоте, или модифицированную форму фермента протокса, которая в естественных условиях встречается в растении, или фермент протоке, который может в естественных условиях встречаться в прокариоте, или фермент протоке, который представляет собой модифицированную форму протеина, который в естественных условиях встречается в прокариоте.

Конкретный вариант осуществления изобретения относится к получению трансгенных растений кукурузы, ткани кукурузы или семени кукурузы и их трансгенного потомства, которые стабильно трансформированы рекомбинантной молекулой ДНК, включающей пригодный промотор, функционирующий в растениях, действенным образом сцепленный со структурным геном, кодирующим немодифицированный фермент протоке прокариота, который устойчив к гербициду.

Кроме того, изобретение относится к получению трансгенных растений, клеток растений, тканей растений и семян растений и их трансгенного потомства, которые были стабильно трансформированы рекомбинантной молекулой ДНК, включающей пригодный промотор, функционирующий в растениях, действенным образом сцепленный со структурным геном, кодирующим немодифицированный фермент протоке эукариота. Это приводит к сверхэкспрессии немодифицированного протокса в растении в количестве, достаточном для преодоления ингибирования фермента гербицидом.

Настоящее изобретение также включает получение растений, которые экспрессируют измененный фермент протоке, толерантный к ингибированию гербицидом в концентрации, которая в нормальных условиях ингибирует активность неизмененного протокса дикого типа. В этом варианте осуществления растение может быть стабильно трансформировано рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей структурный ген, кодирующий устойчивый протокса, или получено методами направленной селекции, с помощью которых устойчивые к гербициду линии выделяют, характеризуют и совершенствуют.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу борьбы с ростом нежелательной растительности, включающему обработку популяции растения с измененной активностью протокса, устойчивой к ингибированию гербицидом в концентрациях, которые обычно ингибируют встречающуюся в естественных условиях активность протокса в этом растении, эффективным количеством ингибирующего протокса гербицида. Растения, подлежащие защите описанным способом, прежде всего представляют собой таковые, которые могут быть потенциальными мишенями для ингибирующих протокса гербицидов, в частности такие важные сельскохозяйственные культуры, как, например, кукуруза и другие зерновые культуры, такие, как пшеница, овес, рожь, сорго, рис, ячмень, просо, густой травяной покров (дерн или газонные травы), кормовые травы и т.п., а также хлопчатник, сахарный тростник, сахарная свекла, масличный рапс и соя. Гербициды, которые относятся к ингибиторам протокса, представляют собой таковые, выбранные из группы, состоящей из арилурацила, дифенилового эфира, оксидиазола, имида, фенилпиперазола, производного пиридина, фенопилата и О-фенилпирролидин- и пиперидинкарбаматных аналогов этого фенопилата.

Настоящее изобретение также относится к получению фермента протокса рекомбинантным путем и способам применения полученного рекомбинантным путем протокса. Таким образом, изобретение дополнительно включает клетки-хозяева и прежде всего клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток растений, клеток животных, бактериальных клеток, дрожжевых клеток и клеток насекомых, стабильно трансформированных рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей пригодный промотор, функционирующий в соответствующей клетке-хозяине, действенным образом сцепленный со структурным геном, кодирующим модифицированный или немодифицированный фермент протоке эукариота, причем клетка-хозяин обладает способностью экспрессировать эту молекулу ДНК.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам применения очищенного протокса для скрининга новых гербицидов, которые воздействуют на активность протокса, и для идентификации мутантов протокса, устойчивых к гербициду.

В частности изобретение относится к способу тестирования химического соединения на его способность ингибировать активность фермента протокса из растения, включающему

(а) объединение фермента протокса и протопорфириногена IX в первой реакционной смеси в условиях, при которых фермент протоке обладает способностью катализировать превращение протопорфириногена IX в протопорфирин IX;

(б) объединение химического соединения, фермента протокса и протопорфириногена IX во второй реакционной смеси в тех же условиях, что и для первой реакционной смеси;

(в) возбуждение первой и второй реакционных смесей волнами длиной от приблизительно 395 до приблизительно 410нм;

(г) сравнение флуоресценции первой и второй реакционных смесей при длинах волн от приблизительно 622 до приблизительно 635нм;

причем химическое соединение обладает способностью ингибировать активность фермента протокса, если флуоресценция второй реакционной смеси существенно меньше, чем флуоресценция первой реакционной смеси.

Кроме того, в изобретении предложен способ идентификации модифицированного фермента протокса, устойчивого к ингибитору протокса, присутствующего в популяции клеток, включающий следующие стадии

(а) культивирование популяции в присутствии ингибитора протокса в количествах, которые ингибируют модифицированную форму фермента протокса;

(б) отбор клеток, полученных на стадии (а), рост которых не был ингибирован; и

(в) выделение и идентификацию фермента протокса, присутствующего в клетках, отобранных на стадии (б).

Гены, кодирующие измененный протокса, могут применяться в качестве селективируемых маркеров в методах трансформации растительной клетки. Таким образом, настоящее изобретение также включает способ селекции растений, тканей растения или клеток растения, трансформированных представляющим интерес трансгеном из нетрансформированных растений, включающий стадии:

(а) трансформацию растения, ткани растения или клетки растения представляющим интерес трансгеном,

способным экспрессироваться растением, и геном, кодирующим измененный протоке, устойчивый к ингибитору протокса;

(б) перенос трансформированных таким образом растений или растительных клеток в питательную среду, содержащую ингибитор протокса; и

(в) отбор растений или растительных клеток, выживших в питательной среде.

Кроме того, настоящее изобретение относится к зондам и способам обнаружения присутствия и выявления формы гена протокса и количественной оценки уровней транскриптов протокса в организме. Эти способы могут применяться для диагностики болезненных состояний, связанных с измененной формой фермента протокса или с измененными уровнями экспрессии фермента протокса.

Один из предметов настоящего изобретения относится к выделенной молекуле ДНК, которая кодирует эукариотическую форму протопорфириноген-оксидазы (обозначенную в настоящем описании как "протоке"), т.е. фермента, который катализирует окисление протопорфириногена IX в протопорфирин IX. Кодирующие последовательности ДНК и соответствующие аминокислотные последовательности для ферментов протокса из *Arabidopsis thaliana* представлены в виде последовательностей SEQ ID NO: 1-4 и 9-10. Кодирующие последовательности ДНК и соответствующие аминокислотные последовательности для ферментов протокса кукурузы представлены в виде последовательностей SEQ ID NO: 5-8.

Любая требуемая эукариотическая ДНК, кодирующая фермент протоке, может быть выделена в соответствии с изобретением. Один способ, касающийся выделения последовательности, кодирующей протоке эукариота, представлен в примере 1. В этом способе клоны кДНК, кодирующей фермент протоке, определяют из библиотеки клонов кДНК, имеющей происхождение из представляющего интерес эукариота, основываясь на их способности придавать ферментативную активность протокса мутантному организму-хозяину, имеющего дефицит этой активности. Пригодными организмами-хозяевами для применения в этом способе являются таковые, которые могут быть использованы для скрининга библиотек экспрессии кДНК и для которых мутанты с дефицитом активности протокса либо доступны, либо могут быть получены традиционными способами. Такие организмы-хозяева включают, но не ограничены ими, *E.coli* (Sasarman и др., *J.Gen. Microbiol.* 113: 297 (1979)), *Salmonella typhimurium* (Xu и др., *J.Bacteriol.* 174: 3953 (1992)) и *Saccharomyces cerevisiae* (Camadro и др., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106: 724 (1982)).

В другом варианте последовательности, кодирующие протоке эукариота, могут быть выделены в соответствии с хорошо известными способами, основанными на гомологии их последовательности с кодирующими протоке последовательностями по настоящему изобретению из *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1, 3 и 9) и из *Zea mays* (SEQ ID NO: 5 и 7). В этих способах всю или часть известной кодирующей протоке последовательности применяют в качестве зонда, который селективно гибридизируется с другими кодирующими протоке последовательностями, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т.е. библиотек геномной или кДНК) из выбранного организма. Такие способы включают скрининг на основе гибридизации посеянных на пластинке библиотек ДНК (либо бляшек, либо колоний; см., например, у Sambrook и др., ред., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) и ПЦР-амплификацию с использованием олигонуклеотидных праймеров, соответствующих доменам последовательности, сохранившимся среди известных аминокислотных последовательностей протокса (см., например, у Innis и др., ред., *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press (1990)). Эти способы наиболее пригодны для выделения кодирующих протоке последовательностей из организмов, родственных организму, из которого имеет происхождение последовательность зонда. Например, следует ожидать, что применение этих способов с использованием в качестве зонда кодирующей последовательности из *Arabidopsis thaliana* или из *Zea mays* будет особенно пригодно для выделения кодирующих протоке последовательностей из других видов растений.

Выделенные последовательности протокса эукариота по настоящему изобретению могут подвергаться манипуляциям в соответствии со стандартными методами геной инженерии для достижения любой поставленной цели. Например, полная последовательность протокса или ее части могут применяться в качестве зондов, способных к специфической гибридизации с последовательностями, кодирующими протоке, и с матричными РНК. Для достижения специфической гибридизации в различных условиях такие зонды включают последовательности, которые являются уникальными среди кодирующих протоке последовательностей, и предпочтительно имеют длину, по крайней мере, 10 нуклеотидов и наиболее предпочтительно, по крайней мере, 20 нуклеотидов. Такие зонды могут применяться для амплификации и анализа, кодирующих протоке последовательностей из выбранного организма путем хорошо известного процесса полимеразно-цепевой реакции (ПЦР). Этот метод может быть пригоден для выделения дополнительных кодирующих протоке последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического метода для определения присутствия в организме кодирующих протоке последовательностей и для выявления взаимосвязи измененных кодирующих последовательностей с определенными вредными условиями, такими, как ауточомное доминантное нарушение у имеющих пониженные уровни активности протокса людей, что характеризуется как нейropsychическими симптомами, так и повреждениями кожи (Brenner и Bloomer, *New Engl. J.Med.* 302: 765 (1980)).

Специфичные для протокса зонды гибридизации также могут быть использованы для картирования положения нативного(ных) гена(ов) протокса эукариота в геноме выбранного организма с использованием стандартных методов, основанных на селективной гибридизации зонда с геномными последовательностями протокса. Эти методы включают, но не ограничены ими, идентификацию полиморфизмов ДНК, выявленных или содержащихся внутри последовательности зонда для протокса, и применение таких полиморфизмов для

5 последующего отщепления гена протокса от других маркеров с известным положением на карте в картируемой популяции, полученной в результате самооплодотворения гибрида двух полиморфных родительских линий (см., например, у Helentjaris и др., Plant. Mol. Biol. 5: 109 (1985); Sommer и др., Biotechniques 12: 82 (1992); D'Ovidio и др., Plant. Mol. Biol. 15: 169 (1990)). Хотя можно ожидать, что любая последовательность протокса эукариота будет пригодна в качестве зонда для картирования генов протокса из любого эукариота, предпочтительными зондами являются такие последовательности протокса из организмов, которые наиболее близкородственны к выбранному организму, и наиболее предпочтительными зондами являются таковые последовательности протокса из выбранного организма. Можно ожидать, что картирование, таким образом, 10 генов протокса будет наиболее целесообразным для целей селекции растений. Например, на основе знания о положении на генетической карте мутантного гена протокса, который обуславливает устойчивость к гербицидам, могут быть идентифицированы фланкирующие маркеры ДНК из соответствующей генетической карты (см., например, у Helentjaris, Trends Genet. 3: 217 (1987)). При интрогрессии признака устойчивости к гербицидам в новую селективируемую линию эти маркеры могут быть, затем применены для мониторинга длины сцепленной с протоксом фланкирующей хромосомной ДНК, еще присутствующей в родительской форме, с которой гибрид скрещивают вновь после каждого круга обратного скрещивания.

15 Специфические для протокса зонды гибридизации также могут применяться для количественной оценки уровней мРНК протокса в организме с использованием стандартных методов, таких, как назерн-блоттинг. Этот метод может быть пригоден в качестве способа диагностики для обнаружения измененных уровней экспрессии протокса, что может быть связано с определенными вредными условиями, такими, как ауточомное доминантное нарушение у людей, характеризующееся как нейropsychическими симптомами, так и повреждениями кожи, имеющих пониженные уровни активности протокса (Brenner и Bloomer, New Engl. J. Med. 302: 765 (1980)).

20 Для рекомбинантного получения фермента в организме хозяина кодирующая протоке последовательность может быть встроена в полигенный экспрессирующий кластер, сконструированный для выбранного хозяина и интродуцированный в хозяина, где его получают рекомбинантным образом. Выбор специфических регуляторных последовательностей, таких, как промотор, сигнальная последовательность, 5'- и 3'-нетранспируемые последовательности и энхансер, может быть осуществлен специалистом в данной области техники. Полученная молекула, содержащая отдельные элементы, сцепленные в соответствующей рамке считывания, может быть встроена в вектор, способный к трансформации в клетке-хозяине. Пригодные для этой 25 цели вектры экспрессии и способы рекомбинантного получения протеина хорошо известны для организмов-хозяев, таких, как E.coli (см., например, у Studier и Moffatt, J.Mol. Biol. 189: 113 (1986); Brosius, DNA, 8: 759 (1989)), дрожжи (см., например, у Schneider и Guarente, Meth. Enzymol. 194: 373 (1991)) и клетки насекомых (см., например, у Luckow и Summers, Bio/Technol. 6: 47 (1988)). Конкретные примеры включают такие плазмиды, как Bluescript (фирма Stratagene, La Jolla, CA), pFLAG (фирма International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT), pTrcHis (фирма Invitrogen, La Jolla, CA) и бакуловирусные векторы экспрессии, например, имеющие происхождение из генома вируса ядерного полиэдроза Autographica californica (AcMNPV). Предпочтительной системой бакуловирус-пус/насекомое являются клетки рVI11392/Sf21 (фирма 30 Invitrogen, La Jolla, CA).

35 Полученный рекомбинантным путем эукариотический фермент протоке пригоден для различных целей. Например, он может применяться для обеспечения ферментативной активности протокса in vitro. Он также может применяться в анализе in vitro для скрининга новых соединений с гербицидной активностью, мишень для которых ранее не была выявлена, с целью определения, могут ли они ингибировать протоке. Такой анализ in vitro также может быть применен в качестве более общего скрининга для идентификации химических соединений, ингибирующих активность протокса, и, следовательно, являющихся потенциальными гербицидами. 40 В другом варианте полученный рекомбинантным путем фермент протоке может применяться для дальнейшей характеристики его связи с известными ингибиторами, чтобы рационально сконструировать новые ингибирующие гербициды, а также толерантные к гербицидам формы фермента.

45 Обычно ингибирующее действие в отношении протокса определяют путем измерения флуоресценции при длинах волн от приблизительно 622 до 635нм после возбуждения длинами волн от приблизительно 395 до 410нм (см., например, у Jacobs и Jacobs, Enzyme 28: 206 (1982); Sherman и др., Plant Physiol. 97: 280 (1991)). Этот анализ основан на том факте, что протопорфирин IX представляет собой флуоресцирующий пигмент, а протопорфириноген IX является нефлуоресцирующим. Экстракты протеина получают из выбранных субклеточных фракций, например, из этиопластов, митохондрий, микросом или плазматических мембран путем дифференциального центрифугирования (см., например, Lee и др., Plant Physiol. 102: 881 (1993); Prado и др., 50 Plant Physiol. 65: 956 (1979); Jackson и Moore в Plant Organelles, Reid ред., стр.1-12; Jacobs и Jacobs, Plant Physiol., 101: 1181 (1993)). Протопорфириноген получают путем восстановления протопорфирина амальгамой натрия, как описано у Jacobs и Jacobs (1982). Реакционные смеси обычно состоят из 100мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота) (pH7,5), 5мМ ЭДТК, 2мМ ДТТ (дителиотреитол), приблизительно 2М протопорфириногена IX и приблизительно 1мг/мл экстракта протеина. До начала ферментативной реакции к экстракту фермента добавляют растворы ингибитора в различных концентрациях, например, в 1мМ, 100мкМ, 10мкМ, 1мкМ, 100нМ, 10нМ, 1нМ, 100пМ. После добавления экстракта протеина в течение нескольких минут регистрируют флуоресценцию и в области линейного изменения вычисляют тангенс угла наклона кривой (скорость реакции). Значение IC<sub>50</sub> определяют путем сравнения тангенса угла наклона реакции в условиях ингибирования с таковым в контрольной реакции.

55 Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает применение протокса в анализе по выявлению устойчивых к ингибитору мутантов протокса. Типичный анализ включает следующие стадии:

(а) инкубирование первого образца протокса и его субстрата, т.е. протопорфириногена IX, в присутствии второго образца, содержащего ингибитор протокса;

(б) измерение ферментативной активности протокса из стадии (а);

(в) инкубирование первого образца мутированного протокса и его субстрата в присутствии второго образца, содержащего тот же самый ингибитор протокса;

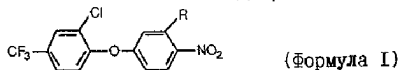
(г) измерение ферментативной активности мутированного протокса из стадии (в); и

(д) сравнение ферментативной активности мутированного протокса с таковой, обеспечиваемой немутированным протоксом.

Реакционная смесь и условия реакции являются теми же, что и для анализа по выявлению ингибиторов протокса (ингибиторный анализ) со следующими модификациями. Во-первых, мутант протокса, полученный аналогично описанному выше, заменяют в одной из реакционных смесей на протоксе дикого типа в ингибиторном анализе. Во-вторых, ингибитор протокса дикого типа присутствует в обеих реакционных смесях. В-третьих, мутированную активность (ферментативная активность в присутствии ингибитора и мутированного протокса) и немутированную активность (ферментативная активность в присутствии ингибитора и протокса дикого типа) сравнивают для определения, наблюдается ли существенное увеличение ферментативной активности в мутированной активности по отношению к немутированной активности. Мутированная активность представляет собой любую меру ферментативной активности мутированного фермента протокса в присутствии пригодного субстрата и ингибитора. Немутированная активность представляет собой любую меру ферментативной активности фермента протокса дикого типа в присутствии пригодного субстрата и ингибитора. За достоверное увеличение принимают увеличение ферментативной активности, превышающее предел погрешности техники измерения, предпочтительно приблизительно двукратное увеличение по сравнению с активностью фермента дикого типа в присутствии ингибитора, более предпочтительно приблизительно пятикратное увеличение, наиболее предпочтительно увеличение более чем приблизительно в десять раз.

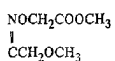
Гербициды, которые ингибируют протоксе, включают многие различные по структуре классы молекул (Duke и др., Weed Sci. 39: 465 (1991); Nandihalli и др., Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193 (1992); Matringe и др., FEBS Lett. 245: 35 (1989); Yanase и Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70 (1989)), включая дифениловые эфиры {например, ацифлуорфен, 5-[2-хлор-4-(трифторметил)фенокси]-2-нитробензойная кислота; ее метиловый эфир; или оксифлуорфен, 2-хлор-1-(3-этокси-4-нитрофенокси)-4-(трифторбензол)}, оксидиазолы (например, оксидиазон, 3-[2,4-дихлор-5-(1-метилэтокси)фенил]-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксидиазол-2-(3H)-он), циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргилоксифенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид, хлорфталим, N-(4-хлорфенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид), фенилгшразолы (например, ТНПП-этил, этил-2-[1-(2,3,4-трихлорфенил)-4-нитропиразолил-5-окси]пропионат; M&B 39279), производные пиридина (например, LS 82-556) и фенопилат и его O-фенилпирролидино- и пиперидинкарбаматные аналоги.

Наиболее важные дифениловые эфиры представляют собой таковые общей формулы



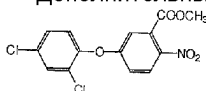
где R обозначает  $-\text{COONa}$  (формула II),  $-\text{CONHSO}_2\text{CH}_3$  (формула III) или  $-\text{COOCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  (формула IV; см. у Maigrot и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 47-51 (1989)).

Дополнительными, представляющими интерес дифениловыми эфирами являются таковые, где R

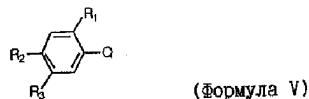


(формула Va; см. у Hayashi и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 53-58 (1989)).

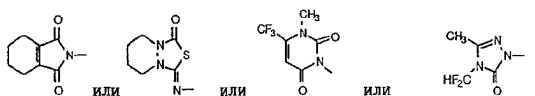
Дополнительным, представляющим интерес дифениловым эфиром является таковой формулы:



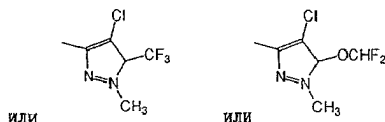
Также важным является класс гербицидов, известных как амиды, имеющие общую формулу



где Q обозначает



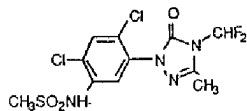
(Формула VI)      (Формула VII)      (Формула VIII)      (Формула IX)



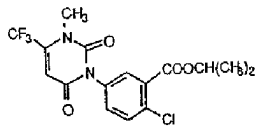
(Формула IXa)      (Формула IXb)

(см. у Hemper и др., (1995) в "Proceedings of the Eighth International Congress of Pesticide Chemistry", Ragdaie и др., ред., Amer. Chem. Soc, Washington, D.C., стр.42-48 (1994)),

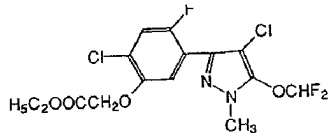
и R<sub>1</sub> обозначает H, Cl или F, R<sub>2</sub> обозначает Cl и R<sub>3</sub> обозначает необязательно замещенный простой эфир, тиоэфир, сложный эфир, amino- или алкильную группу. В другом варианте R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> вместе могут образовывать 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо. Примерами имидных гербицидов, представляющих особый интерес, являются



(Формула X)

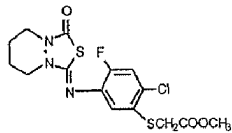


(Формула XI)



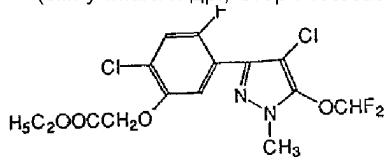
(Формула XII)

(см. у Miura и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 35-40 (1993)),



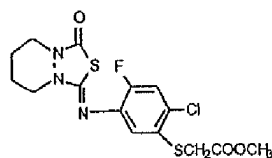
(Формула XIII)

(см. у Miura и др., Crop Protection Conference-Weeds: 35-40 (1993)),



(Формула XII)

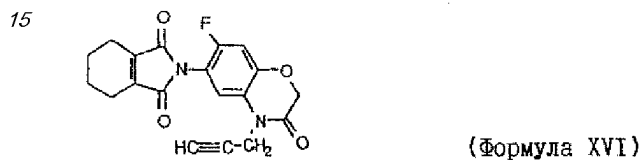
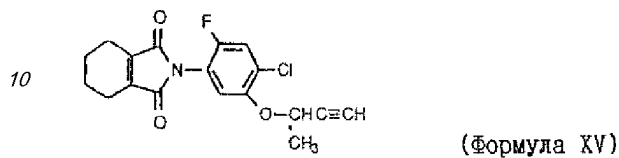
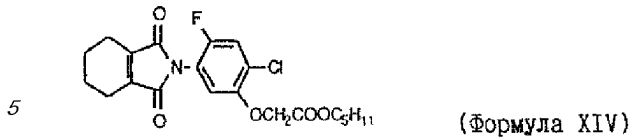
(см. у Miura и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 35-40 (1993)),



(Формула XIII)

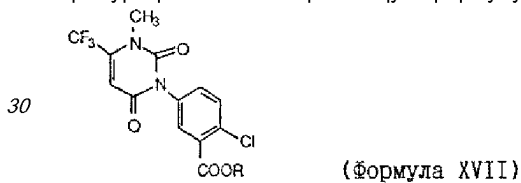
U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2



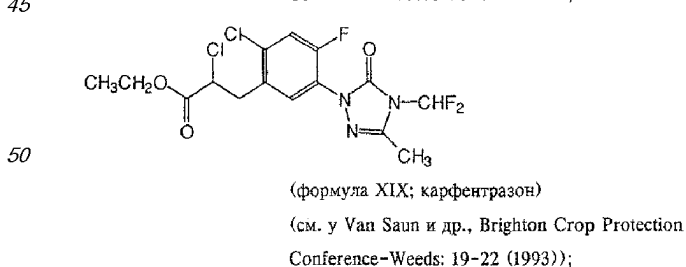
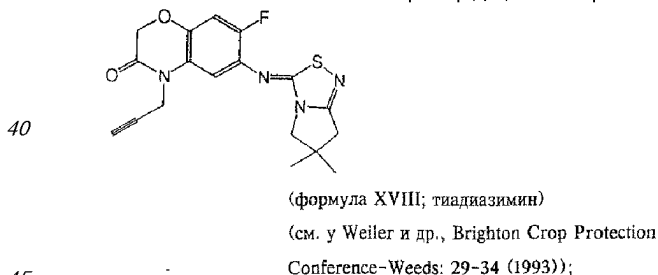
25 Гербицидная активность вышеуказанных соединений описана в Proceedings of 1991 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council) (формулы X и XVI), Proceedings of 1993 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council) (формулы XII и XIII), в патенте США 4746352 (формула XI) и в Abstracts of the Weed Science Society of America, том.33, стр.9 (1993) (формула XIV).

30 Наиболее предпочтительными имидными гербицидами являются таковые, классифицированные как арилурацилы и имеющие общую формулу

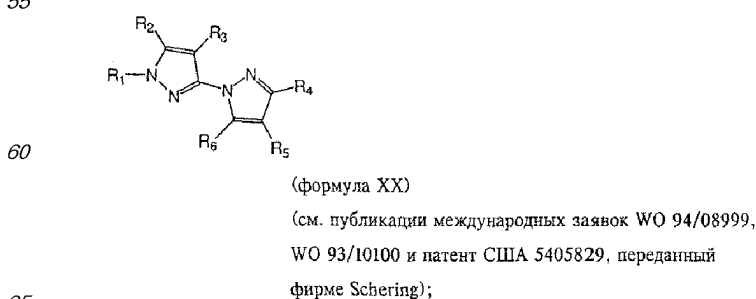


35 где R обозначает группу (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенилокси)карбонил-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил, как описано в патенте США 5183492, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

40 Также важными являются гербициды, имеющие общую формулу:

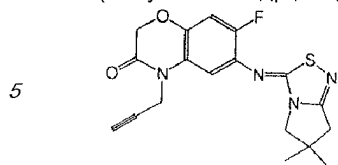


55 N-замещенные пиразолы общей формулы:



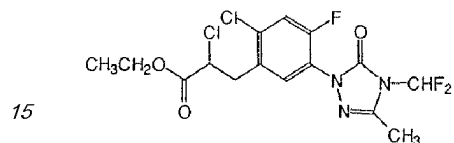
65 N-фенил пиразолы, такие, как

(см. у Weiter и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 29-34 (1993));



(формула XVIII; тиадиазимиин)

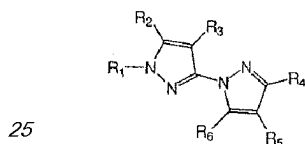
10 (см. у Weiter и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 29-34 (1993));



(формула XIX; карфентразон)

20 (см. у Van Saun и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 19-22 (1993));

25 N-замещенные пиразолы общей формулы:



(формула XX)

30 (см. публикации международных заявок WO 94/08999, WO 93/10100 и патент США 5405829, переданный фирме Schering);

N-фенил пиразолы, такие, как

(см. у Van Saun и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 19-22 (1993));  
N-замещенные пиразолы общей формулы:

35

40

45

50

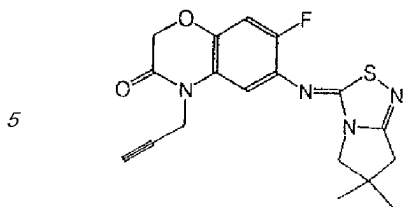
55

60

65

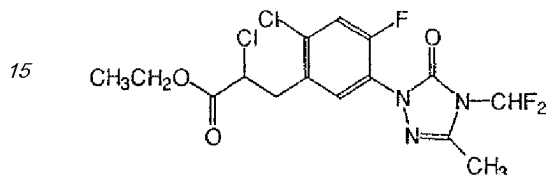
U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2



(формула XVIII; триадазимин)

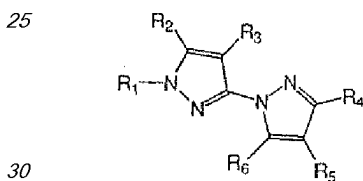
10 (см. у Weiler и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 29-34 (1993));



(формула XIX; карфентразон)

20 (см. у Van Saun и др., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 19-22 (1993));

N-замещенные пиразолы общей формулы:



(формула XX)

(см. публикации международных заявок WO 94/08999,

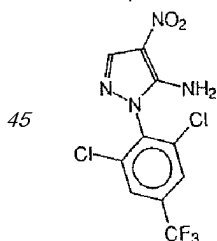
WO 93/10100 и патент США 5405829, переданный

35 фирме Schering);

N-фенил пиразолы, такие, как

40 (см. публикацию международных заявок WO 94/08999, WO 93/10100 и патент США 5405829, переданный фирме Schering);

N-фенил пиразолы, такие, как



(формула XXI; нипираклофен)

(см. стр. 621 в "The Pesticide Manual", 9-е изд., ред.

C.R. Worthing, British Crop Protection Council, Surrey

(1991));

55 (см. стр.621 в "The Pesticide Manual", 9-е изд., ред. C.R.Worthing, British Crop Protection Council, Surrey (1991)); и 3-замещенные-2-арил-4,5,6,7-тетрагидроиндазолы (Lyga и др., Pesticide Sci. 42: 29-36 (1994)).

60 Уровни гербицида, которые обычно являются достаточными для ингибирования активности протокса, соответствуют нормам расхода, известным в данной области техники и частично зависящим от внешних факторов, таких, как окружающая среда, время и способ обработки. Например, в случае имидных гербицидов, представленных формулами V-IX, и в частности таковых, представленных формулами X-XVIII, интервал норм расхода составляет от 0,0001 до 10кг/га, предпочтительно от 0,005 до 2кг/га. Эта норма расхода или концентрация гербицида может различаться в зависимости от требуемого действия и конкретного используемого соединения и может быть определена способами, известными в данной области техники.

65 Настоящее изобретение, кроме того, относится к растениям, ткани растения и семенам растения, толерантным к гербицидам, которые ингибируют активность протокса, встречающуюся в этих растениях в естественных условиях, причем толерантность обусловлена измененной ферментативной активностью

5 протокса. Характерные растения включают любые растения, которые обрабатывают этими гербицидами в соответствии с их обычным предназначением. Предпочтительными являются важные сельскохозяйственные культуры, т.е. важные представители покрытосемянных и голосемянных растений, такие, как хлопчатник, соя, рапс, сахарная свекла, кукуруза, рис, пшеница, ячмень, овес, рожь, сорго, просо, густой травяной покров (дерн или газонные травы), кормовые травы, дернообразующие злаки и т.п.

10 Под "измененной ферментативной активностью протокса" понимают ферментативную активность протокса, отличную от таковой, которая встречается в растении в естественных условиях (т.е. активность протокса, которая встречается в естественных условиях в отсутствие прямого или косвенного воздействия человека на эту активность), устойчивую к гербицидам, которые ингибируют активность, встречающуюся в естественных условиях. Измененная ферментативная активность протокса может быть придана растению по изобретению путем увеличения экспрессии протокса дикого типа, чувствительного к гербицидам, экспрессии в растении измененного, толерантного к гербицидам эукариотического фермента протокса, экспрессии в растении немодифицированной или модифицированной бактериальной формы фермента протокса, которая является устойчивой к гербицидам, или комбинацией этих способов.

15 Получение измененной активности фермента протокса путем увеличения экспрессии приводит к достижению уровня протокса в клетке растения, по крайней мере, достаточного для преодоления ингибирования роста, вызываемого гербицидом. Уровень экспрессируемого протокса обычно, по крайней мере, в два раза, предпочтительно в пять раз, более предпочтительно, по крайней мере, в десять раз превышает количество, экспрессируемое в естественных условиях. Увеличенная экспрессия может быть обусловлена множественными копиями гена протокса дикого типа; множественным распространением кодирующей протоке последовательности внутри гена протокса (т.е. амплификацией гена) или мутацией в некодирующей регуляторной последовательности эндогенного гена протокса в клетке растения. Растения, обладающие такой измененной ферментативной активностью, могут быть получены направленной селекцией в растениях. Этот способ известен в данной области техники. См., например, патент США 5162602 на имя Somers и др., патент США 4761373 на имя Anderson и др. и указанные в них ссылки. Эти растения также могут быть получены с помощью методов генной инженерии, известных в данной области техники.

20 Увеличенная экспрессия чувствительного к гербицидам протокса также может быть получена путем стабильной трансформации клетки растения рекомбинантной или химерной молекулой ДНК, содержащей промотор, способный стимулировать экспрессию связанного структурного гена в клетке растения, сцепленного с гомологичным или гетерологичным структурным геном, кодирующим протоке. Понятие "гомологичность" подразумевает, что ген протокса выделяют из организма, таксономически идентичного клетке растения-мишени. Понятие "гетерологичность" подразумевает, что ген протокса выделяют из организма, таксономически отличного от клетки растения-мишени. Гомологичные гены протокса могут быть получены путем комплементации бактериального или дрожжевого ауксотрофного мутанта библиотекой экспрессии кДНК из растения-мишени. См., например, пример 1 и у Snustad и др., Genetics 120: 1111-1114 (1988) (глутамин-синтаза кукурузы); у Delaimey и др., Mol. Genet. 221: 299-305 (1990) (пирролин-5-карбоксилатредуктаза сои); у Frisch и др., Mol. Genet. 228: 287-293 (1991) (дигидродипиколинат-синтаза кукурузы); у Eller и др., Plant Mol. Biol. 18: 557-566 (1992) (3-изопропилмалат-дигидрогеназа хлоропласта рапса); в Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88: 1731-1735 (1991); у Minet и др., Plant J. 2: 417-422 (1992) (дигидрооротат-дегидрогеназа) и ссылки, указанные в этих публикациях. Другие известные способы включают скрининг библиотек геномной или кДНК высших растений, например, в отношении последовательностей, которые перекрестно гибридизируются с зондами специфичных нуклеиновых кислот, или скрининг библиотек экспрессии для получения ферментов протокса, которые вступают в перекрестную реакцию со специфичными зондами-антителами. Предпочтительный способ включает комплементацию ауксотрофного мутанта hemG E. coli библиотекой кДНК кукурузы или Arabidopsis thaliana.

30 Примеры промоторов, способных функционировать в растениях или в клетках растений, т.е. таковых, способных стимулировать экспрессию связанных структурных генов, таких, как протокса, в растительных клетках, включают промоторы 19S или 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и двойные промоторы CaMV; промоторы нопалин-синтазы; промоторы протеина, связанного с патогенезом (PR); промоторы малой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (ssuRUBISCO) и т.п. Предпочтительными являются промотор актина риса (McElroy и др., Mol. Gen. Genet. 231:150 (1991)), промотор убикитина кукурузы (EP 0342926; Taylor и др. Plant Cell Rep. 12: 491 (1993)) и промотор Pr-1 из табака, Arabidopsis или кукурузы (см. международную заявку PCT/IB95/00002 на имя Ryals и др., полностью включенную в данное описание в качестве ссылки). Также предпочтительными являются промотор 35S и усиленный или двойной промотор 35S, такой, как описанный у Kay и др., Science 236: 1299-1302 (1987), и двойной промотор 35S, клонированный в pCGN2113, депонированный под номером ATCC 40587, которые описаны в европейской заявке EP-A 0392225, соответствующие данные из которой, относящиеся к настоящему изобретению, полностью включены в данное описание в качестве ссылки. Сами промоторы могут быть модифицированы в соответствии с известными в данной области техники методиками таким образом, чтобы манипулировать длиной промотора для повышения экспрессии протокса.

40 55 60 65 Сигнальные или транзитные пептиды могут быть слиты с последовательностью, кодирующей протоке, в химерных конструкциях ДНК по изобретению, чтобы направить транспорт экспрессируемого фермента протокса в требуемое место действия. Примеры сигнальных пептидов включают таковые, сцепленные в естественных условиях с протеинами, связанными с патогенезом, например, PR-1, PR-2 и т.п. См., например, Payne и др., Plant Mol. Biol. 11: 89-94 (1988). Примеры транзитных пептидов включают транзитные пептиды хлоропласта,

такие, как описанные у von Heijne и др., *Plant Mol. Biol.* 9: 104-126 (1991); Mazur и др., *Plant Physiol.* 85: 1110 (1987); Vorst и др., *Gene* 65: 59 (1988), и транзитные пептиды митохондрий, такие, как описанные у Boutry и др., *Nature* 328: 340-342 (1987). Предполагают, что транзитные пептиды хлоропласта и митохондрий будут наиболее приемлемы для настоящего изобретения, так как ферментативная активность протокса обычно содержится в митохондриях и хлоропласте. Наиболее предпочтительными для применения являются транзитные пептиды хлоропласта, поскольку существует предположение, что ингибирование ферментативной активности протокса в хлоропластах является первичной основой действия ингибирующих протоксе гербицидов (Witkowski и Hailing, *Plant Physiol.* 87: 632 (1988); Lehnen и др., *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 239 (1990); Duke и др., *Weed Sci.* 39: 465 (1991)). Сюда также включены последовательности, которые приводят к локализации кодируемого протеина в различных клеточных компартментах, таких, как вакуоли. См., например, у Neuhaus и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10362-10366 (1991) и Chrispeels, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 21-53 (1991). Соответствующие данные из этих публикаций, относящиеся к настоящему изобретению, полностью включены в данное описание в качестве ссылки.

Химерная(ые) конструкция(и) ДНК по изобретению может (гут) содержать множественные копии промотора или множественные копии структурных генов протокса. Кроме того, конструкция(и) может (гут) включать кодирующие последовательности для маркеров и кодирующие последовательности для других пептидов, таких, как сигнальные или транзитные пептиды, каждый в соответствующей рамке считывания с другими функциональными элементами в молекуле ДНК. Получение таких конструкций соответствует обычному уровню техники в данной области.

Пригодные маркеры включают пептиды, обуславливающие устойчивость к гербициду, антибиотику или лекарству, такие, как обуславливающие, например, устойчивость к гигромицину, канамицину, G418, гентамицину, линкомицину, метотрексату, глифосфату, фосфинотрицину или т.п. Эти маркеры могут применяться для отделения клеток, трансформированных химерными конструкциями ДНК по изобретению, от ^трансформированных клеток. Другими пригодными маркерами являются пептидные ферменты, которые можно легко обнаружить с помощью реакции визуально, например, с помощью цветной реакции, в их число входят люцифераза, В-глюкуронидаза или В-галактозидаза.

Измененную активность фермента протокса можно также получить путем генерирования или идентификации модифицированных форм выделенной эукариотической кодирующей протоксе последовательности, имеющей, по крайней мере, одно аминокислотное замещение, дополнение или делецию, которые кодируют измененный фермент протоксе, устойчивый к гербициду и ингибирующий неизменную, встречающуюся в естественных условиях форму (т.е. формы, встречающиеся в естественных условиях в эукариоте, не подвергавшиеся манипуляциям со стороны человека либо непосредственно с помощью методологии рекомбинантной ДНК, либо косвенным путем с помощью избирательной селекции и т.д.). Гены, кодирующие такие ферменты, могут быть получены с помощью различных стратегий, известных в данной области техники. Первая общая стратегия включает технику прямого или непрямого мутагенеза микроорганизмов. Например, пригодный для генетических манипуляций микроорганизм, такой, как *E.coli* или *S.cerevisiae*, может быть подвергнут неспецифическому мутагенезу *in vivo* с помощью, например, УФ-излучения или этил- или метилметансульфоната. Методы мутагенеза описаны, например, у Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1972); Davis и др., *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1980); Sherman и др., *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1983); и в патенте США 4975374 (на имя Goodman и др.). Микроорганизм, выбранный для мутагенеза, содержит эукариотический ген протокса с нормальной чувствительностью к гербицидам и зависит от активности протокса, обусловленной этим геном. Подвергнутые мутагенезу клетки выращивают в присутствии гербицида в концентрациях, которые ингибируют немодифицированный фермент протоксе. Колонии подвергнутого мутагенезу микроорганизма, которые в присутствии ингибитора растут лучше, чем неподвергнутый мутагенезу микроорганизм (т.е. проявляющие устойчивость к ингибитору), отбирают для дальнейшего анализа. Гены протокса из этих колоний выделяют либо путем клонирования, либо с помощью амплификации с использованием полимеразно-цепевой реакции и определяют их последовательности. Последовательности, кодирующие измененный фермент протоксе, затем клонируют вновь в микроорганизме для подтверждения их способности обуславливать устойчивость к ингибитору.

Второй метод получения мутантных, несущих устойчивость к гербициду аллелей эукариотического фермента протокса, включает прямую селекцию в растениях. Например, воздействие ингибитора протокса, такого, как описан выше, на подавление роста растений, таких, как *Arabidopsis*, соя или кукуруза, может быть выявлено путем помещения семян, стерилизованных с использованием известных в данной области техники методов, на чашки в простую минимальную солевую среду, содержащую возрастающие концентрации ингибитора. Такие концентрации составляют 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 110, 300, 1000 и 3000 частей на миллион (част./млн). Самую низкую дозу, при которой можно наблюдать воспроизводимое существенное ингибирование роста, применяют для последующих экспериментов.

Мутагенез растительного материала может быть использован для увеличения частоты, с которой устойчивые аллели встречаются в выбранной популяции. Подвергнутый мутагенезу семенной материал может быть получен из различных источников, включая химический или физический мутагенез семян или химический или физический мутагенез пыльцы (см. Neuffer, в *Maize for Biological Research*, Sheridan, изд. Univ. Press, Grand Forks, ND., стр.61-64 (1982)), которую затем применяют для оплодотворения растений, после чего собирают полученные мутантные семена M<sub>1</sub>. Обычно для *Arabidopsis* семена M<sub>2</sub> (фирма Lehle Seeds, Tuscon, AZ), т.е. потомство семян растений, выращенных из семян, подвергнутых мутагенезу с помощью химических

соединений, таких, как этилметансульфонат, или физических агентов, таких, как гамма-излучение или быстрые нейтроны, высевают в чашки с плотностью до 10000 семян/чашку (диаметром 10см) на минимальную солевую среду, содержащую соответствующую концентрацию ингибитора для селекции на устойчивость. Проростки, которые продолжают расти, и остаются зелеными в течение 7-20 дней после высевания, пересаживают в почву и выращивают до созревания и получения семян. Потомство этих семян тестируют на устойчивость к гербициду. Если признак устойчивости является доминантным, растения, семена которых расщепляются в соотношении 3:1 (устойчивые:чувствительные), вероятно, являются гетерозиготными по гену устойчивости в поколении  $M_2$ . Растения, все семена которых обладают устойчивостью, вероятно, являются гомозиготными по гену устойчивости в поколении  $M_2$ . Такой мутагенез интактных семян и скрининг семян их поколения  $M_2$  также может быть осуществлен на других видах, например, на сое (см., например, патент США 5084082 (на имя Sebastian)). Мутантные семена, которые будут подвергнуты скринингу на толерантность к гербициду, также могут быть получены в результате оплодотворения пыльцой, подвергнутой мутагенезу химическим или физическим агентами.

Для подтверждения того, что генетической основой устойчивости является измененный ген протокса, могут быть использованы два подхода. Во-первых, аллели гена протокса из растений, проявивших устойчивость к ингибитору, могут быть выделены с помощью ПЦР с праймерами, основанными либо на консервативных областях в последовательностях кДНК протокса у *Arabidopsis* и кукурузы, приведенных ниже в SEQ ID NO: 1 3, 5, 7, либо более предпочтительно на основе неизмененных последовательностей гена протокса из растения, использованного для получения устойчивых аллелей. После секвенирования аллелей для определения присутствия мутаций в кодирующей последовательности аллели могут быть протестированы на их способность обуславливать устойчивость к ингибитору в растениях, в которых были трансформированы предполагаемые, обуславливающие устойчивость аллели. Эти растения могут представлять собой либо растения *p.Arabidopsis*, либо любое другое растение, рост которого чувствителен к ингибиторам. Во-вторых, гены протокса могут быть картированы на основе известных полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (см., например, у Chang и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6856-6860 (1988); Nam и др., Plant Cell 1: 699-705 (1989)). Признак устойчивости может быть картирован независимо с использованием тех же маркеров. Если устойчивость является следствием мутации в гене протокса, признак устойчивости будет расположен на карте в положении, неотличимом от положения гена протокса.

Третий способ получения устойчивых к гербициду аллелей протокса представляет собой селекцию в культурах растительной клетки. Эксплантаты растительной ткани, например, эмбрион, листовые диски и т.д., или активно растущий каллюс, или суспензию культур растения, представляющего интерес, выращивают на определенной среде с отсутствием гема в присутствии возрастающей концентрации ингибирующего гербицида или аналогов ингибитора, пригодных для применения в лабораторных условиях. В различных культурах получают различную интенсивность роста. В определенных культурах получают быстрорастущие варианты колоний, которые продолжают расти даже в присутствии концентраций ингибитора, вызывающих в норме подавление роста. Частота, с которой появляются такие быстрорастущие варианты, может быть увеличена путем обработки химическим или физическим мутагеном до воздействия на ткани или клетки гербицидом. Предполагаемые аллели гена протокса, придающие резистентность, выделяют и тестируют аналогично описанному в предшествующих абзацах. Аллели, которые идентифицированы как обуславливающие устойчивость к гербициду, затем могут быть сконструированы для оптимальной экспрессии и трансформированы в растения. В другом варианте растения могут быть регенерированы из тканевых или клеточных культур, содержащих эти аллели.

Четвертый способ включает мутагенез чувствительных к гербициду генов протокса дикого типа в бактериях или дрожжах с последующим культивированием микроорганизма в среде, лишенной гема, но содержащей ингибирующие концентрации ингибитора, и затем с отбором тех колоний, которые растут в присутствии ингибитора. Более конкретно кДНК растения, такую, как кДНК, кодирующую протокс *Arabidopsis* или кукурузы, клонируют в микроорганизме, у которого первоначально отсутствует активность протокса. Примеры таких микроорганизмов включают ауксотрофных мутантов *E.coli*, *S.typhimurium* и *S.cerevisiae*, в том числе штамм *E.coli* SASX38 (Sasarnan и др., J.Gen. Microbiol., 113: 297 (1979), штамм *S.typhimurium* TE2483 или TT13680 (Xu и др., J.Bacteriol., 174: 3953 (1992)) и мутант дрожжей hem14-1 (Camadro и др., Biochem. Biophys. Res. Comm., 106: 724 (1982)). Трансформированный микроорганизм затем подвергают мутагенезу *in vivo*, такому, как описанный непосредственно выше, или мутагенезу *in vitro* с помощью любого из нескольких химических или ферментативных методов, известных в данной области техники, например, с помощью бисульфита натрия (Shortle и др., Methods Enzymol. 100: 457-468 (1983); метоксиламина (Kadonaga и др., Nucleic Acids Res., 13: 1733-1745 (1985); насыщенного сайтнаправленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (Hutchinson и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 710-714 (1986); или с помощью различных стратегий, основанных на ошибке включения полимеразы (см., например, Shortle и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 1588-1592 (1982); Shiraishi и др., Gene, 64: 313-319 (1988); и у Leung и др., Technique, 1: 11-15 (1989)). Колонии, которые растут в присутствии концентраций ингибитора, подавляющих в нормальных условиях рост, отбирают и очищают путем повторных посевов штрихом. Их плазмиды очищают и тестируют на способность придавать устойчивость к ингибитору путем ретрансформации их в лишенном протокса микроорганизме. Затем определяют последовательности ДНК протокса кДНК-вставок из плазмид, прошедших этот тест.

Когда аллель устойчивого к гербициду протокса идентифицирован, он может быть сконструирован с помощью методов генной инженерии для оптимальной экспрессии в культурном растении. Эта методика может включать изменение кодирующей последовательности устойчивого аллеля для оптимальной экспрессии в

представляющем интерес виде культурного растения. Способы модификации кодирующих последовательностей для достижения оптимальной экспрессии в конкретных видах культурных растений хорошо известны (см., например, у Perlak и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3324 (1991); Koziel и др., Bio/Technol. 11: 194 (1993)). Генетическое конструирование аллеля протокса для оптимальной экспрессии может также включать сцепление действенным образом соответствующих регуляторных последовательностей (т.е. промотора, сигнальной последовательности, терминатора транскрипции). Предпочтительными промоторами будут те, которые обуславливают высокий уровень конститутивной экспрессии, или более предпочтительно те, которые обуславливают высокий специфический уровень экспрессии в тканях, чувствительных к повреждению гербицидом.

Рекомбинантные молекулы ДНК могут быть интродуцированы в растительную клетку многочисленными известными в данной области техники путями. Для специалиста в данной области техники, очевидно, что выбор метода может зависеть от типа растения, предназначенного для трансформации, т.е. однодольного или двудольного. Пригодные методы трансформации растительных клеток включают микроинъекцию (Crossway и др., BioTechniques 4: 320-334 (1986)), электропорацию (Riggs и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5602-5606 (1986); трансформацию, медируемую Agrobacterium (Hinchee и др., Biotechnology 6: 915-921 (1988), прямой перенос гена (Paszowski и др., EMBO J. 3: 2717-2722 (1984)) и баллистическую бомбардировку частицами с использованием приспособлений, поставляемых фирмами Agracet, Inc., Madison, Wisconsin и Dupont, Inc. Wilmington, Delaware (см., например, у Sanford и др., патент США 4945050; и McCabe и др., Biotechnology 6: 923-926 (1988)). См. также у Weissinger и др., Annual Rev. Genet. 22: 421-477 (1988); Sanford и др., Panicle Science and Technology 5: 27-37 (1987) (лук); Christou и др., Plant Physiol. 87: 671-674 (1988) (соя); McCabe и др., Bio/Technology 6: 923-926 (1988) (соя); Datta и др., Bio/Technology 8: 736-740 (1990) (рис); Klein и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4305-4309 (1988) (кукуруза); Klein и др., Bio/Technology 6: 559-563 (1988) (кукуруза); Klein и др., Plant Physiol. 91: 440-444 (1988) (кукуруза); Fromm и др., Bio/Technology 8: 833-839 (1990); и Gordon-Kamm и др., Plant Cell 2: 603-618 (1990) (кукуруза).

Под объем настоящего изобретения также подпадают трансгенные растения, в частности трансгенные фертильные растения, трансформированные с помощью вышеуказанных способов, и их бесполое и/или половое потомство, которое сохраняет устойчивость или, по крайней мере, толерантность к ингибированию гербицидом в концентрациях, которые в норме ингибируют встречающуюся в естественных условиях активность протокса в растении. Наиболее предпочтительными являются гибридные растения, которые устойчивы или, по крайней мере толерантны к ингибированию гербицидом в концентрациях, которые в норме ингибируют встречающуюся в естественных условиях активность протокса в растении.

Трансгенное растение по изобретению может быть двудольным или однодольным растением. Предпочтительны однодольные растения семейства злаковых (Graminaceae), включающие растения р.р. Lolium, Zea, Triticum, Triticale, Sorghum, Saccharum, Bromus, Oryzae, Avena, Hordeum, Secale и Setaria.

Наиболее предпочтительными являются трансгенные кукуруза, пшеница, ячмень, сорго, рожь, овес, дернообразующие травы и рис.

Среди двудольных растений наиболее предпочтительными в контексте настоящего изобретения являются соя, хлопчатник, табак, сахарная свекла, масличный рапс и подсолнечник.

Термин "потомство" включает потомство трансгенных растений, полученное как "бесполом", так и "половым" путем. Под это понятие также подпадают все мутанты и сорта, получаемые с помощью известных способов, таких, как, например, слияние клеток или селекция мутантов, и которые еще проявляют характерные свойства исходного трансформированного растения наряду со всеми продуктами скрещивания и слияния трансформированного растительного материала.

Еще один предмет изобретения относится к пролиферационному материалу трансгенных растений.

Под пролиферационным материалом трансгенных растений в контексте настоящего изобретения понимают любой растительный материал, который может быть размножен половым или бесполом путем *in vivo* или *in vitro*. Наиболее предпочтительными согласно настоящему изобретению являются протопласты, клетки, каллюсы, ткани, органы, семена, эмбрионы, пыльца, яйцеклетки и зиготы наряду с любым другим материалом для размножения, полученным из трансгенных растений.

Части растений, такие, как, например, цветки, стебли, плоды, листья, корни, развившиеся у трансгенных растений или у их потомства, ранее трансформированных с помощью способа по изобретению и, следовательно, состоящие, по крайней мере, частично из трансгенных клеток, также являются предметом настоящего изобретения.

До поступления в продажу материала для размножения растений (плоды, клубни, зерна, семенной материал), прежде всего семенного материала, в качестве коммерческого продукта его обычно обрабатывают защитным покрытием, содержащим гербициды, инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскициды или смеси нескольких этих препаратов, при необходимости вместе с дополнительными носителями, поверхностно-активными веществами или способствующими нанесению адьювантами, обычно применяемыми в технике получения препаративных форм для обеспечения защиты от повреждения, вызванного бактериями, грибами или насекомыми-вредителями.

Для обработки семенного материала защитное покрытие может быть нанесено на семенной материал либо путем пропитки клубней или зерен жидким составом, либо покрытием их сложной влажной или сухой композицией. Кроме того, в особых случаях возможно использование других способов обработки растений, например, путем направленной обработки почек или плода.

Семенной материал растения по изобретению, содержащий последовательность ДНК, кодирующую протеин

из эукариота, обладающего активностью протопорфириноген-оксидазы (протоке) по изобретению, может быть обработан защищающим семенной материал покрытием, содержащим соединение для обработки семенного материала, такое, как, например, каптан, карбоксин, тирам (TMTD<sup>®</sup>), металаксил (Arpon<sup>®</sup>) и пиримифос-метил (Actellic<sup>®</sup>), а также другие соединения, которые обычно применяют для обработки семенного материала.

Таким образом, еще один предмет настоящего изобретения относится к материалу для размножения растений, предназначенному для культивируемых растений, и прежде всего к семенному материалу растения, которое обрабатывают защищающим семенной материал покрытием, обычно применяемым для обработки семенного материала.

Если устойчивый к гербициду аллель протокса получают путем прямой селекции в культурном растении или в культуре растительной клетки, из которой может быть регенерировано культурное растение, он может быть перенесен в коммерческие сорта с использованием традиционных способов селекции для получения толерантной к гербициду культуры без необходимости генетического конструирования аллеля и его трансформации в растении. В другом варианте аллель устойчивости к гербициду может быть выделен, подвергнут генетическому конструированию для оптимальной экспрессии и затем трансформирован в требуемом сорте.

Гены, кодирующие измененный протоке, устойчивый к ингибитору протокса, также могут применяться в качестве селектируемых маркеров в способах трансформации растительной клетки. Например, растение, растительная ткань или растительные клетки, трансформированные трансгеном, могут также быть трансформированы геном, кодирующим измененный протоке, способный быть экспрессированным растением. Трансформированные таким образом клетки переносят в содержащую ингибитор протокса среду, в которой будут выживать только трансформированные клетки. Ингибиторы протокса, которые, вероятно, должны быть наиболее приемлемы в качестве селектирующих агентов, представляют собой дифениловые эфиры {например, ацифлуорфен, 5-[2-хлор-4-(трифторметил)феноксид]-2-нитробензойная кислота; ее метиловый эфир; или оксифлуорфен, 2-хлор-1-(3-этокси-4-нитрофеноксид)-4-(трифторбензол)}, оксидиазолы (например, оксидиазон, 3-[2,4-дихлор-5-(1-метилэтокси)фенил]-5-(1,1-диметилэтил)-1,3,4-оксадиазол-2-(3H)-он), циклические имиды (например, S-23142, N-(4-хлор-2-фтор-5-пропаргилоксифенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид; хлорфталим, N-(4-хлорфенил)-3,4,5,6-тетрагидрофталимид), фенилпиразолы (например, ИПП-этил, этил-2-[1-(2,3,4-трихлорфенил)-4-нитропиразолил-5-окси]пропионат; M&B 39279), производные пиридина (например, LS 82-556) и фенопилат и его O-фенилпириролидино- и пиперидинкарбаматные аналоги. Способ применим к любой растительной клетке, способной быть трансформированной измененным геном, кодирующим протоке, и может быть применен для любого представляющего интерес трансгена. Экспрессия трансгена и гена протокса может стимулироваться одним и тем же промотором, функционирующим в растительных клетках, или различными промоторами.

Ниже изобретение более подробно поясняется на примерах. Эти примеры приведены только для иллюстрации и не ограничивают объем изобретения, если не указано иное.

#### Депонирование

Следующие молекулы векторов для целей процедуры патентования были депонированы в коллекции культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), Северный региональный исследовательский центр (Northern Regional Research Center, 1815 North university Street, Peoria, Illinois 61604, USA) в указанное ниже время.

Protox-1, в векторе pBluescript SK, был депонирован 5 апреля 1994г. под обозначением pWDC-2 (NRRL №B-21238).

Protox-2, в векторе pFL61, был депонирован 5 апреля 1994г. под обозначением pWDC-1 (NRRL №B-21237).

MzProtox-1, в векторе pBluescript SK, был депонирован 20 мая 1994 г. под обозначением pWDC-4 (NRRL №B-21260) и представлен в последовательности SEQ ID NO: 5.

MzProtox-1, в векторе pBluescript SK, был повторно депонирован 11 июля 1994г. под обозначением pWDC-4 (NRRL №B-21260N) и представлен в последовательности SEQ ID NO: 5.

MzProtox-2, в векторе pBluescript SK, был депонирован 20 мая 1994г. под обозначением pWDC-3 (NRRL №B-21259) и представлен в последовательности SEQ ID NO: 7.

Protox-3, в векторе pFL61, был депонирован 10 июня 1994г. под обозначением pWDC-5 (NRRL №B-21280).

pMzC-IVa1, в векторе pBluescript SK, был депонирован 30 сентября 1994г. под обозначением pWDC-8 и получил каталожный номер NRRL №21340.

pAraC-2Cys, в векторе pFL61, был депонирован 14 ноября 1994 г. под обозначением pWDC-7 и получил каталожный номер NRRL №21339N.

#### Примеры

Стандартные рекомбинантные ДНК и способы молекулярного клонирования, применяемые в настоящем исследовании, хорошо известны в данной области техники и описаны у T.Maniatis, E.F.Fritsch и J.Sambrook в Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982), и у T.J.Silhavy, M.X. Berman и L.W.Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

Пример 1: Выделение кДНК Arabidopsis, кодирующих гены протокса путем функциональной комплементации мутанта E.coli.

Получали и амплифицировали библиотеку кДНК Arabidopsis thaliana (фирма Landsberg) в плазмидном векторе pFL61 (Minet и др., Plant J. 2: 417-422 (1992)). Приобретали вторую библиотеку кДНК Arabidopsis (фирма Columbia) в векторе лямбда UniZap (фирма Stratagene) и амплифицировали в качестве плазмид

pBluescript путем массового исключения *in vivo* исходного фага. Получали мутант hemG штамма E.coli SASX38 (Sasarman и др., J.Gen. Microbiol. 113: 297 (1979)) и поддерживали на L-среде, содержащей 20мг/мл гематина (фирма United States Biochemicals). Плазмидные библиотеки трансформировали в SASX38 путем электропорации с использованием прибора Bio-Rad Gene Pulser в условиях, рекомендованных производителем. Клетки высевали на L-агар, содержащий 100мг/мл ампициллина, с плотностью приблизительно 500000 трансформантов/чашку диаметром 10см. Клетки инкубировали при 37°C в течение 40 часов при слабой освещенности и отбирали на основе способности расти без добавления экзогенного гема. Гем-прототрофов выделяли из библиотеки pFL61 с частотой 400/10<sup>7</sup> и из библиотеки pBluescript с частотой 2/10<sup>7</sup>. ДНК плазмиды выделяли из 24 колоний для анализа последовательности. Каждую из 24 колоний повторно трансформировали в SASX38 для проверки способности к комплементации.

Анализ последовательности выявил наличие двух классов предполагаемых клонов протокса. Девять из них относились к типу, обозначенному "Protox-1". Каждый имел происхождение из одного и того же гена, а два представляли собой полноразмерные клоны. кДНК имеет длину 1719 пар оснований и кодирует протеин с молекулярной массой 57,7кДа. N-концевая пептидная последовательность имеет признаки, характерные для транзитного пептида хлоропласта, состоящего из приблизительно 60 аминокислот. Исследование базы данных с помощью программы GAP (Deveraux и др., Nucleic Acids Res. 12: 387-395 (1984)) выявило гомологию с протеином hemY (протоке) *B. subtilis* (Hansson и Hederstedt, 1992, Dailey и др., J.Biol. Chem. 269: 813 (1994)). Два протеина были подобны на 53% и идентичны на 31% с областями высокой гомологии, включая предполагаемый домен связывания динуклеотида протеина hemY (Dailey и др., J.Biol. Chem. 269: 813 (1994)).

Другие 15 клонов кДНК относились к типу, обозначенному "Protox-2". По-видимому, они также происходят от одного гена. Вероятно, полноразмерная кДНК имеет длину 1738 пар оснований и кодирует протеин с молекулярной массой 55,6кДа. Конец, содержащий аминокислотную группу, в определенной мере характерен для митохондриального транзитного пептида. Протеин Protox-2 имеет ограниченную гомологию с Protox-1 (подобие на 53%, идентичность на 28%) и с протоком *B.subtilis* (подобие на 50%, идентичность на 27%).

Protox-1, в векторе pBluescript SK, был депонирован 5 апреля 1994г. под обозначением pWDC-2 (NRRL №B-21238).

Protox-2, в векторе pFL61, был депонирован 5 апреля 1994г. под обозначением pWDC-1 (NRRL №B-21237).

кДНК *Arabidopsis*, кодирующие Protox-1, содержащийся в pWDC-2, и Protox-2, содержащийся в pWDC-1, приведены ниже в последовательностях SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно.

Пример 2: Выделение кДНК кукурузы, кодирующих гены протокса, путем функциональной комплементации мутанта E.coli.

У фирмы Stratagene приобретали библиотеку кДНК кукурузы *Zea mays* (имбредная линия B73) в векторе лямбда UniZap и превращали в библиотеку pBluescript путем массового исключения *in vivo*. Вторую библиотеку кДНК, сделанную по заказу в векторе UniZap, приобретали у фирмы Clontech и аналогичным образом превращали в плазмиды pBluescript. Выбор функциональных генов протокса из кукурузы осуществляли аналогично описанному выше в примере 1 для библиотек *Arabidopsis*.

Из библиотеки фирмы Stratagene выделяли два гем-прототрофа в 10 трансформантах, обладающих способностью к рекомплементации, и секвенировали. Эти кДНК были идентичными и оказались гомологичными Protox-1 *Arabidopsis*. Этот клон кукурузы, обозначенный как MzProtox-1, является неполным. кДНК имеет длину 1698 пар оснований и кодирует только предполагаемый зрелый фермент протоке; в ней нет последовательности транзитного пептида и нет кодона инициации метионина. Ген идентичен на 68% гену Protox-1 *Arabidopsis* на нуклеотидном уровне и идентичен на 78% (подобие на 87%) на аминокислотном уровне (см. таблицу 1).

Из библиотеки фирмы Clontech выделяли один гем-прототроф в 10<sup>7</sup> трансформантах, обладающий способностью к рекомплементации, и секвенировали. кДНК, по-видимому, является полной, имеет длину 2061 пар оснований и кодирует протеин с молекулярной массой 59кДа. Этот клон является характерным для кукурузы гомологом Protox-2 *Arabidopsis*, и его обозначили как MzProtox-2. Ген идентичен на 58% гену Protox-2 *Arabidopsis* на нуклеотидном уровне и идентичен на 58% (подобие на 76%) на аминокислотном уровне (см. таблицу 2). Клон из кукурузы имеет N-концевую последовательность, которая на 30 аминокислот длиннее, чем таковая в клоне *Arabidopsis*. Так же, как и для клонов *Arabidopsis*, гомология между двумя генами протокса кукурузы довольно низка, идентичность между последовательностями двух протеинов составляет только 31%.

MzProtox-1, в векторе pBluescript SK, депонированный 20 мая 1994г. под обозначением pWDC-4 (NRRL №B-21260), представлен в последовательности SEQ ID NO: 5.

MzProtox-1, в векторе pBluescript SK, повторно депонированный 11 июля 1994г. под обозначением pWDC-4 (NRRL №B-21260N), представлен в последовательности SEQ ID NO: 5.

MzProtox-2, в векторе pBluescript SK, депонирован 20 мая 1994г. под обозначением pWDC-3 (NRRL №B-21259), представлен в последовательности SEQ ID NO: 7.

Пример 3: Выделение дополнительных генов протокса на основе гомологии последовательности с известными последовательностями, кодирующими протоке

Библиотеку фага или плазмиды высевают с плотностью приблизительно 10000 бляшек на чашки Петри диаметром 10см и после выращивания растений в течение ночи при 37°C осуществляют съём бляшек при помощи фильтра. Съёмы бляшек зондируют с помощью одной из кДНК, представленных в SEQ ID NO: 1,3,5 или 7, меченной по <sup>32</sup>P-дЦТФ методом рассеянной затравки с использованием набора PrimeTime (фирма International Biotechnologies, Inc. New Haven, CT). Применяют следующие условия гибридизации: 7%-ный додецилсульфат натрия (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub> с pH7,0, 1mM ЭДТК при 50°C. После гибридизации в течение ночи



```

1 .....MASGAVAD.HQIEAVSGKRVAV 21
1 MLALTASASSASSHPYRHASAHTRRPLRAVLAMAGSDDPRAAPARSVAV 50
22 VGAGVSGLAAYKLSRGLNVTVEADRVGGKLRVSMQGLIWDEGANT 71
51 VGAGVSGLAAYRLRQSGVNVTVFEAADRAGGKIRTNSEGGFVWDEGANT 100
72 MTEAEPEVGSLLDDGLREKQFPISQKRYIVRNGVPVMLPTNPIELVT 121
101 MTEGEWEASRLIDDGLQDKQYPSQHKRYIVKDGAPALIPSDPISLMK 150
122 SSVLSTQSKFQILLEPFLWKK...KSSKVDASAEESVSEFFQRHFQGE 167
151 SSVLSTKSKIALFFEPFLYKKNRNSGKVEEHLSESVGSGFCERHFGRE 200
168 VVDYLIDPFVGGTSAADPDSLMSKHSFPDLWNVEKSPGSIIVGAIRTKFA 217
201 VVDYFVDFVAGTSAGDPELSIRHAFPALWNLERKYGSIIVGAILSKLA 250
218 AKGGKSRDTKSSPGRKGRGFSFSGKGMQILPDTLCKSLSHDEINLDSK 267
251 AKGDPVKTRHDSGKRRNRVSPSPFHGMQSLINALHNEVGGDNVKGTE 300
268 VLSLS..YNSGSRQENWSLSCVSHNETQRQ...NPHYDAVIMTAPLCNVK 312
301 VLSLACTFDGVPALGRWSISVDSKSGDKDLASNQTFDAVIMTAPLSNVR 350
313 EMKVMKGGQPFQNLNPEINYMLPSVLITFTTEKVKRPLEGFGVLIPSK 362
351 RMKFTKGGAPVVDLFLPKMDYLPLSLMTAFKDDVKKPLEGFGVLIPYK 400
363 E.QKHGPKTLGLTFFSSMMFPDRSPSDVHLYTTFIGGSRNOELAKASTDEL 411
401 EQQKHGLKTLGLTFFSSMMFPDRAPDDQYLYTTFVGGSHNRDLGAPTSIL 450
412 KQVVTSDLQRLGVEGEPVSNHYRKAFFLYDSSYDVMEDIAKRMEND 461
451 KQLVTSDLKLLGVEGQPTFVKHVVWGNAPPLYGHDYSVLEATEKMEKN 500
462 LPGFFYAGNHRGGLSVGKSIASGCKAADLVISYLESCSNDKKNPNDL* 509
501 LPGFFYAGNSKDLAVGSVIASGSKAADLAISYLESHTKHNSH*... 545

```

Пример 4: Выделение загрязненного дрожжами клона Protox из библиотеки кДНК Arabidopsis

Для идентификации любых редких кДНК, обладающих активностью протокса, осуществляли второй скрининг библиотеки Arabidopsis в векторе pFL61 таким же образом, как это описано выше, получая вновь сотни комплементирующих клонов. Приблизительно 600 из них помещали индивидуально на сетчатые пластинки и инкубировали при 28°C в течение 18 часов. Осуществляли двукратные съемы с фильтра на мембраны для скрининга колоний/бляшек (фирма NEN) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК Protox-1 и Protox-2 удаляли из их векторов путем разложения с помощью EcoRI/XhoI и NotI соответственно. Вставки разделяли с помощью гель-электрофореза в 1,0%-ной легкоплавкой агарозе SeaPlaque GTG (фирма FMC), вырезали и метили по P путем рассеянной затравки (Life Technologies). Один набор съемов гибридизовали с каждым зондом. Условия гибридизации и промывки соответствовали таковым, описанным у Church и Gilbert, 1984.

Колонии (-20), которые не проявили выраженную гибридизацию с Protox-1 или с Protox-2, амплифицировали в жидкой культуре и получали ДНК плазмиды. ДНК разлагали с помощью NotI, два экземпляра образцов разгоняли на 1%-ном агарозном геле и подвергали саузерн-блоттингу на фильтре типа Gene Screen Plus [фирма NEN (New England Nuclear)]. Зонды двух известных генов Protox метили и гибридизовали по описанной выше методике. Было обнаружено два идентичных клона, которые не представляли собой ни Protox-1, ни Protox-2. Было установлено, что такой клон рекомплементирует мутант SASX38, хотя он растет очень медленно, и он был обозначен как Protox-3.

Protox-3 в векторе pFL61 был депонирован 10 июня 1994г. под обозначением pWDC-5 (NRRL №B-21280). Было установлено, что эта кодирующая последовательность должна иметь происхождение из ДНК дрожжей, которые присутствуют в качестве побочного загрязнителя в библиотеке кДНК Arabidopsis. ДНК дрожжей, кодирующая Protox-3, входящая в pWDC-5, представлена ниже в виде SEQ ID NO: 9.

Пример 5: Демонстрация чувствительности клона протокса растения к ингибирующим протоксе гербицидам в бактериальной системе

Жидкие культуры Protox-1/SASX38, Protox-2/SASX38 и pBluescript/XLI-Blue выращивали в среде L amp<sup>100</sup>. Аликвоты объемом сто микролитров каждой культуры высевали в среду L amp<sup>100</sup>, содержащую различные концентрации (1,0нМ-10мМ) ингибитора протокса, а именно, гербицида из класса арилурацила формулы XVII. Двойные наборы чашек инкубировали в течение 18 часов при 37°C либо при слабом освещении, либо в полной темноте.

Штамм E.coli протоке<sup>+</sup> XLI-Blue не проявил чувствительности к гербициду при любой изученной концентрации, что согласуется с опубликованными данными об устойчивости нативного бактериального фермента к аналогичным гербицидам. Protox-1/SASX38 проявил выраженную чувствительность к гербициду, причем "газон" бактерии почти полностью уничтожался концентрациями ингибитора ниже 10нМ. Protox-2/SASX38 также оказался чувствительным, но только к более высокой концентрации (10мМ) гербицида. Воздействие гербицида на оба штамма протокса из растений было более сильным при слабой освещенности, но также проявлялось на чашках, содержавшихся в полной темноте. Токсичность гербицида полностью элиминировалась при добавлении в чашки 20мг/мл гематина.

Различная толерантность к гербициду между двумя штаммами протокса из растений, вероятно, является скорее результатом различной экспрессии из этих двух плазмид, чем любым присущим ему различием в чувствительности фермента. Protox-1/SASX38 растет существенно медленнее, чем Protox-2/SASX3S в любой

УДК 715.36

УА 71536 С2

среде с дефицитом гема. Кроме того, штамм MzProtox-2/SASX38, сравнимый по скорости роста с Protox-1/SASX38 Arabidopsis, также является очень чувствительным к более низким концентрациям гербицида (10-100нМ). Первичная характеристика клона Protox-3 дрожжей показала, что он также чувствителен к гербициду.

Пример 6: Селекция на устойчивость генов протокса растений к гербицидам-ингибиторам протокса в системе экспрессии E.coli

Ингибирование ферментов протоксов растений в бактериальной системе пригодно для крупномасштабного скрининга мутаций, обуславливающих устойчивость к гербициду в генах растений. Первичные эксперименты по выявлению зависимости доза-реакция, сделанные путем высевания жидких культур, дали появление высокой частоты "устойчивых" колоний даже к высоким концентрациям гербицида. Эта устойчивость не была обусловлена плазмидой, как показал анализ ретрансформации/чувствительности к гербициду. Плазмиды, трансформирующие протоке в мутанте SASX38 и высеванные непосредственно на чашки, содержащие гербицид, почти полностью устраняли эту фоновую проблему.

Плазмиды с протоксом растительного происхождения мутируют различными способами, используя опубликованные методы химического мутагенеза [например, с помощью бисульфита натрия (Shortle и др., Methods Enzymol. 100: 457-468 (1983)); метоксиламина (Kadonaga и др., Nucleic Acids Res. 13: 1733-1745 (1985)); насыщенного сайт-специфического мутагенеза (Hutchinson и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 710-714 (1986)); или различных стратегий, основанных на ошибке включения полимеразы (см., например, у Shortle и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 1588-1592 (1982); Shiraishi и др., Gene 64: 313-319 (1988); и у Leung и др., Technique 1: 11-15 (1989))]. Ожидаемые позитивные мутанты промотора вследствие мутагенеза всей плазмиды исключают путем повторного клонирования кодирующей последовательности в векторе дикого типа и повторного тестирования. Если предполагается, что более высокая экспрессия приведет к лучшему росту в отсутствие гербицида, то возможен также визуальный скрининг кодирующей последовательности мутантов.

Любые гены протокса растений, экспрессирующие устойчивость к гербициду в бактериальной системе, могут быть сконструированы для оптимальной экспрессии и трансформированы в растениях с применением стандартных методов, приведенных в данном описании. Затем полученные растения могут быть обработаны гербицидом для подтверждения и количественной оценки уровня устойчивости, обуславливаемого введенным геном протокса.

Пример 7: Конструкции для экспрессии в растениях устойчивого(вых) к гербициду гена(ов) протокса микроорганизма

Кодирующие последовательности для гена протокса B subtilis hemY (Hansson и Hederstedt, J.Bacteriol. 174: 8081 (1992); Dailey и др., J.Biol. Chem., 269: 813 (1994)) и для гена протокса E.coli hemG (Sasarman и др., Can. J.Microbiol. 39: 1155 (1993)) выделяли из лабораторных штаммов путем ПЦР-амплификации с применением стандартных условий и фланкирующих праймеров, сконструированных из опубликованных последовательностей. Известно, что эти гены кодируют устойчивые к гербициду формы фермента протокса.

Применяя стандартные методики перекрывающего ПЦР-слияния (Ausubel и др., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)), оба бактериальных гена сливали с двумя различными последовательностями транзитного пептида хлоропласта Arabidopsis (СТР). Первый представлял собой СТР из синтазы ацетоксикислоты (AHAS, Mazur и др., Plant Physiol. 85: 1110 (1987)), который должен обеспечивать импорт в строму хлоропласта. Второй имел происхождение из гена пластоцианина Arabidopsis (Vorst и др., Gene 65: 59 (1988)), который имеет состоящий из двух частей транзитный пептид. Аминоконцевая часть этого СТР ориентирует протеин в хлоропласт, где конец с карбоксильной группой направляет его в мембраны тилакоида. Все четыре гибридных гена клонировали за промотором 2X35S в бинарном векторе экспрессии, сконструированном для получения трансгенных растений путем трансформации агробактерии.

После выделения кДНК протокса Arabidopsis и кукурузы транзитный пептид хлоропласта из Protox-1 или MzProtox-1 также может быть слит с двумя бактериальными протеинами протокса способом, описанным выше.

Векторы, описанные выше, могут быть, затем трансформированы в требуемых видах растений, а полученные трансформанты могут быть проанализированы в отношении увеличенной устойчивости к гербициду.

Пример 8: Смена домена генов Arabidopsis/B.subtilis для получения химерного, устойчивого к гербициду протокса

Одним из способов, который может быть использован для получения гена протокса, как обладающего устойчивостью к гербициду, так и способного обеспечивать эффективную ферментативную активность протокса в растении, является слияние части(ей) бактериального и растительного генов протокса. Полученные химерные гены могут быть, затем подвергнуты скринингу для выделения тех, которые способны обеспечить активность устойчивого к гербициду протокса в клетке растения. Например, последовательности пептида протокса Arabidopsis и B.subtilis (hemY) в достаточной степени колинеарны с областями высокой гомологии. Кодирующую последовательность hemY клонируют в рBluescript и тестируют на ее способность экспрессировать активность устойчивого к гербициду протокса в SASX38. Химерные гены Protox-1/hemY конструируют с применением методики слияния на основе ПЦР с последующим обратным лигированием в вектор рBluescript. Исходный обмен осуществляют приблизительно в середине протеинов. Эти гибриды тестируют на функционирование протокса путем комплементации и затем анализируют в отношении устойчивости к гербициду путем высевания в среду с гербицидом, применяя интактные Protox-1 и hemY в качестве контроля.

Пример 9: Получение толерантных к гербициду растений с помощью сверхэкспрессии генов протокса

растения

Для экспрессии протеина Arabidopsis или кукурузы в трансгенных растениях соответствующую полноразмерную кДНК встраивали в вектор экспрессии pCGN1761ENX, имеющий происхождение из pCGN1761, следующим образом. pCGN1761 разлагали в его уникальном сайте EcoRI и лигировали с фрагментом двухцепочечной ДНК, включающим два олигонуклеотида, имеющих последовательности 5'-AAT TAT GAC GTA ACG TAG GAA TTA GCG GCC CGC TCT CGA GT-3' (SEQ ID NO: 11) и 5'-AAT TAG TCG AGA GCG GCC GCG AAT TCC TAC GTT ACG TCA T-3' (SEQ ID NO: 11). Полученная плаزمида pCGN1761ENX содержала уникальные сайты EcoRI, NotI и XhoI, расположенные между дублированным промотором 35S из вируса мозаики цветной капусты (Кау и др., Science 236: 1299-1302 (1987) и 3'-нетранспируемыми последовательностями гена tml Agrobacterium tumefaciens. Эту плазмиду разлагают и лигируют с фрагментом, образованным в результате разложения рестриктазой одной из плазмид, несущей кДНК протокса, так, чтобы она несла полную кДНК протокса. Из этой плазмиды вырезают фрагмент XbaI, содержащий кДНК протокса Arabidopsis, фланкируемую дублированным промотором 35S и 3'-нетранспируемыми последовательностями гена tml A. tumefaciens. Этот фрагмент XbaI встраивают в бинарный вектор pCIB200 в его уникальном сайте XbaI, расположенном между пограничными последовательностями Т-ДНК. Полученную плазмиду, обозначенную как pCIB200protox, трансформируют в штамм A. tumefaciens CIB542. См., например, у Ukness и др., Plant Cell, 5: 159-169 (1993).

Листовые диски Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc заражают штаммом A. tumefaciens CIB542, несущим pCIB200IGPD, как описано у Hoersch и др., Science, 227: 1229, (1985). Устойчивые к канамицину проростки из 15 независимых листовых дисков переносят в среду для выращивания, затем пересаживают в почву и полученные растения выращивают в теплице до созревания. Семена от этих растений собирают и проращивают в агаровой среде MS, содержащей канамицин. Большое количество проростков, устойчивых к канамицину от каждого независимого первичного трансформанта выращивают в теплице до созревания и затем собирают их семена. Эти семена проращивают в агаровой среде MS, содержащей канамицин.

Линии растения, дающие проростки, обладающие исключительной устойчивостью к канамицину, являются гомозиготными по встроенному гену и их подвергают дальнейшему исследованию. Листовые диски каждой из 15 независимых трансгенных линий вырезают с помощью бумажного пуансона и помещают на агаровую среду MS, содержащую различные увеличивающиеся концентрации гербицида, ингибирующего протоке.

Через три недели два набора из 10 дисков от каждой линии взвешивали и регистрировали результаты. Трансгенные линии, более устойчивые к действию ингибитора, чем нетрансформированные растения дикого типа, отбирают для дальнейшего анализа.

Из листьев каждой из этих линий экстрагируют РНК. Общую ДНК из каждой независимой гомозиготной линии и из нетрансгенных контрольных растений разделяют с помощью электрофореза на агарозном геле в присутствии формальдегида (Ausubel и др., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York (1987)). Гель наносят на нитроцеллюлозную мембрану (Ausubel и др., выше) и гибридизируют с радиоактивно меченной кДНК протокса Arabidopsis. Условия гибридизации и смыва являются теми же, которые описаны у Church и Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1991-1995 (1984). Остаток на фильтре подвергают автордиографии и определяют интенсивные полосы РНК, соответствующие трансгену протокса, во всех толерантных к гербициду линиях трансгенных растений.

Для дальнейшей оценки устойчивости линий со сверхэкспрессией протокса растения выращивают в теплице и обрабатывают различными концентрациями ингибирующего протоке гербицида.

Пример 10: Выращивание суспензионных культур клеток табака

Среда

MX1: Эта среда состоит из среды Murashiga и Skoog ("MS", T. Murashiga и др., Physiol. Plant. 15: 473-497, 1962), содержащей основные соли, побочные соли и Fe-ЭДТК (фирма Gibco №500-1117; 4,3г/л), 100мг/л миоинозитола, 1мг/л никотиновой кислоты, 1мг/л пиридоксина-HCl, 10мг/л тиамин-HCl, 2-3г/л сахарозы, 0,4мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,04мг/л кинетина, pH5,8. Среду стерилизуют путем автоклавирования.

N6: Эта среда включает макроэлементы, микроэлементы и Fe-ЭДТК, как описано у C-C. Chu и др., Scientia Sinica, 18: 659 (1975), и следующие органические соединения: пиридоксин-HCl (0,5мг/л), тиамин-HCl (0,1мг/л), никотиновую кислоту (0,5мг/л), глицин (2,0мг/л) и сахарозу (30,0мг/л). Раствор автоклавируют. Окончательное значение pH равно 5,6.

Примечание: макроэлементы готовят в виде маточного раствора 10-кратной концентрации, а микроэлементы в виде маточного раствора 1000-кратной концентрации. Маточный раствор витамина обычно готовят в 100-кратной концентрации.

Суспензию культивируемых клеток линии S3 Nicotiana tabacum (Harms и DiMaio, J. Plant Physiol, 137: 513-519, 1991) выращивают в жидкой среде для культивирования MX1. 25мл среды MX1, содержащейся в 100мл колбах Эрленмейера, инокулируют 10мл культуры клеток, предварительно выращенных в течение 7 дней. Клетки инкубируют при 25°C в темноте на вращающемся шейкере при 100об/мин (с амплитудой 2см). Клетки пересевают с 7-дневными интервалами путем инокулирования аликвотного образца в свежую среду с помощью декантирования или пипетирования приблизительно 90% суспензии клеток с последующим пополнением свежей средой для получения требуемого объема суспензии. В течение 10 дней роста после инокуляции 250-350мг клеток получают 5-8г сырой массы клеток.

Пример 11: Получение культур клеток табака, толерантных к гербицидным ингибиторам протокса, путем выращивания клеток на отвердевшей среде для селекции

Клетки предварительно выращивают аналогично описанному в примере 10. Клетки собирают путем

седиментации или путем кратковременного центрифугирования при 500хg и удаляют использованную среду. Затем клетки разбавляют свежей средой для культивирования для получения плотности клеток, достаточной для высевания клеток на чашках и составляющей приблизительно 10000 колониеобразующих единиц на мл. Для высевания клетки в малом объеме среды (приблизительно 1мл) равномерно распределяют по верхней поверхности отвердевшей среды для культивирования (MX1, 0,8% агара), содержащей необходимую концентрацию ингибитора. Используют приблизительно 20-30мл среды на чашку Петри диаметром 10см. Пригодную концентрацию ингибитора определяют на основе кривой доза-реакция (пример 14), и она является по крайней мере в два раза выше, чем  $IC_{50}$  для чувствительных клеток дикого типа.

Чашки с культурой, содержащие клетки, распределенные на среде для селекции, инкубируют при нормальных условиях для роста при 25-28°C в темноте до образования колоний. Образовавшиеся колонии клеток переносят в свежую среду, содержащую ингибитор в необходимой концентрации.

В предпочтительной модификации описанного метода предварительно выращенную суспензию культивируемых клеток сначала распределяют в малом объеме жидкой среды по верхней поверхности отвердевшей среды. Добавляют равное количество теплой жидкой агаровой среды (1,2-1,6% агара), выдерживавшейся в расплавленном состоянии при приблизительно 40°C, и чашку сразу же осторожно приводят во вращение, чтобы равномерно распределить клетки по поверхности среды и смешать клетки и агаровую среду до того, как среда отвердеет.

В другом варианте клетки смешивают с расплавленной агаровой средой до распределения по поверхности среды для селекции. Этот метод имеет то преимущество, что клетки внедряются и иммобилизируются в тонком слое отвердевшей среды на верхней поверхности среды для селекции. Это дает возможность лучшей аэрации клеток по сравнению с клетками, внедренными в весь объем, составляющий 20-30мл.

Пример 12: Получение культур клеток табака, толерантных к гербицидному ингибитору протокса, путем выращивания клеток в жидкой среде для селекции

Клетки, выращенные аналогично описанному в примере 10, инокулируют в пригодной концентрации клеток в жидкую среду MX1, содержащую необходимую концентрацию гербицидного ингибитора протокса. Клетки инкубируют и выращивают по описанной в примере 10 методике. Через 7-10 дней клетки пересевают соответствующим образом в зависимости от скорости роста, применяя, свежую среду, содержащую необходимую концентрацию ингибитора.

В зависимости от концентрации ингибитора рост клеток может быть менее интенсивным, чем при отсутствии ингибитора.

Пример 13: Получение культур клеток табака с повышенными уровнями фермента протокса

Для получения культур клеток или каллюса с повышенными уровнями фермента протокса суспензионные культуры клеток или каллюс поэтапно переносят в среду со все более высокими концентрациями гербицидного ингибитора протокса. В частности осуществляют следующие этапы.

Колонии клеток, образовавшихся из высеванных клеток в соответствии с примером 11, переносят в жидкую среду MX1, содержащую такую же концентрацию ингибитора протокса, которая была использована при селекции в соответствии с примером 11, чтобы образовать суспензионные культуры. В другом варианте отобранные суспензионные культуры клеток, полученные в соответствии с примером 12, пересевают в жидкую среду MX1, содержащую такую же концентрацию ингибитора протокса, которая была использована для селекции в соответствии с примером 12.

Культуры пересевают 1-20 раз с недельными интервалами и затем пересевают в среду MX1, содержащую следующую более высокую концентрацию гербицида. Клетки выращивают для получения 1-10 пассажей в среде, содержащей эту более высокую концентрацию гербицида. Затем клетки переносят в среду MX1, содержащую следующую более высокую концентрацию гербицида.

В другом варианте кусочки отобранного каллюса в соответствии с примером 11 переносят в отвердевшую среду MX1, дополненную до необходимой концентрации гербицида. Перенос в среду с более высокой концентрацией осуществляют в соответствии с методикой, описанной в предыдущем абзаце, за исключением того, что используют отвердевшую среду.

Пример 14: Измерение роста клеток в зависимости от дозы в суспензионных культурах

Для получения кривой доза-реакция определяют рост клеток при различных концентрациях гербицида. Суспензионные культуры чувствительных к гербицидному ингибитору протокса клеток S3 табака дикого типа и толерантных к гербициду селектированных или трансгенных клеток S3 и толерантных к гербициду селектированных или трансгенных клеток предварительно выращивают в жидкой среде, как описано в примере 11, до высокой плотности клеток в течение 2-4 дней. Клетки отмывают от использованной среды и добавляют свежую среду без гербицида для получения необходимой плотности клеток (приблизительно 150мг сырого веса (СВ) клеток на мл суспензии). Затем образец суспензии клеток объемом 2,5мл, содержащий приблизительно 250-300мг СВ клеток, инокулируют в приблизительно 30мл жидкой среды с необходимой концентрацией гербицида, содержащейся в колбе Эрленмейера объемом 100мл. Предпринимают соответствующие меры, чтобы инокулировать одинаковое количество клеток в каждую колбу. Каждая колба содержит одинаковый объем среды. На одну концентрацию гербицида инокулируют 3-6 колб-дубликатов. Концентрацию гербицида выбирают из следующего ряда: ноль (=контроль), 0,1част./млрд, 0,3част./млрд, 1част./млрд, 3част./млрд, 10част./млрд, 30част./млрд, 100част./млрд, 300част./млрд, 1000част./млрд, 3000част./млрд и 10000част./млрд. В момент инокуляции отбирают несколько образцов инокулированных клеток для определения массы клеток, инокулированных в одну колбу.

Затем клетки инкубируют для роста в контролируемых условиях при 28°C в темноте в течение 10 дней.

Клетки собирают путем сливания содержимого каждой колбы на диск из фильтровальной бумаги, присоединенный к всасывающему устройству для удаления всей жидкости и получения массы достаточно сухих свежих клеток. Определяют массу свежих клеток. Сухую массу образца можно определить после высушивания.

Определяют рост клеток, выражают в виде прироста клеток за 10 дней, а также в виде процента по отношению к росту клеток при отсутствии гербицида в соответствии со следующей формулой: (конечная масса клеток, выращенных с присутствием гербицида, минус масса инокулята  $\times 100$ , деленная на конечную массу клеток, выращенных без гербицида, минус масса инокулята). Значения  $IC_{50}$  определяют из графика, построенного по этим данным (относительная масса клеток по отношению к концентрации гербицида). Значение  $IC_{50}$  представляет собой концентрацию гербицида, при которой рост клеток составляет 50% от роста клеток в контроле (клетки, выращенные в отсутствие гербицида).

В модификации этого метода несколько кусочков каллюса, полученных из культуры клеток, устойчивых к гербициду, как описано в примерах 11 и 13, переносят на отвердевшую среду для культивирования каллюса, содержащую различные концентрации гербицида. Относительный рост определяют после 2-6-недельного культивирования путем взвешивания кусочков каллюса и сравнения с ростом культуры в контроле в среде без гербицида. Однако метод с использованием суспензии более предпочтителен вследствие его более высокой точности.

Пример 15: Определение перекрестной толерантности

Для определения степени, в которой клетки проявляют толерантность по отношению к аналогичным или другим гербицидам, повторяют описанную в примере 14 методику по выращиванию клеток во все возрастающих концентрациях выбранных гербицидов. Для цели сравнения для каждого гербицида определяют относительный рост клеток и его значение  $IC_{50}$ .

Пример 16: Определение стабильности фенотипа толерантности к гербициду с течением времени

Для определения, сохраняется ли со временем фенотип толерантности к гербициду культуры клеток, клетки переносят из среды, содержащей гербицид, в среду без гербицида. Клетки выращивают по описанной в примере 10 методике в отсутствие гербицида в течение 3 месяцев, применяя регулярный пересев через соответствующие интервалы времени (7-10 дней для суспензионных культур; 3-6 недель для культур каллюса). Затем определенные количества клеток переносят обратно в среду, содержащую гербицид, и культивируют в течение 10 дней (суспензионные культуры) или 4 недель (культуры каллюса). Относительный рост определяют согласно описанному в примере 14.

Пример 17: Индукция и культивирование эмбрионного каллюса из ткани щитка кукурузы

Початки растений самоопыляющейся кукурузы инбредной линии Funk 2717 собирают через 12-14 дней после опыления. Удаляют листовую обертку, и початки стерилизуют в течение 15 минут при встряхивании в 20%-ном растворе коммерчески доступного отбеливателя Chlorox с добавлением нескольких капель детергента для лучшего смачивания. Затем початки промывают несколько раз стерильной водой. Все дальнейшие стадии осуществляют в асептических условиях в стерильном вытяжном шкафу с потоком воздуха. Эмбрионы длиной 1,5-2,5мм удаляют из зерен с помощью шпателя и помещают, направляя ось эмбриона вниз, в среду для культивирования MS, содержащую 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 2мг/л и 3%-ную сахарозу, отвержденную с помощью 0,24%-ного Gelrite®.

Эмбрионный каллюс образуется на ткани щитка эмбрионов в течение 2-4 недель роста культуры при 28°C в темноте. Каллюс удаляют из эксплантата и переносят в свежую отвердевшую среду MS, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л. Пересев эмбрионного каллюса повторяют с недельными интервалами. Пересевают только части каллюса, имеющие эмбрионную морфологию.

Пример 18: Селекция культур клеток кукурузы, толерантных к гербицидным ингибиторам протокса

а) Селекция с применением эмбрионного каллюса

Эмбрионный каллюс, полученный по методике из примера 17, переносят в среду для поддержания каллюса, состоящую из среды N6, содержащей 2,4-Д в концентрации 2мг/л, 3%-ную сахарозу и ингибитор протокса в концентрации, достаточной для замедления роста, но которая не оказывает вредного воздействия на эмбрионность культуры, и отверждают с помощью Gelrite®. Для увеличения частоты мутаций, толерантных по отношению к гербициду, культуры предварительно обрабатывают до селекции химическим мутагеном, например, этилметансульфонатом, или физическим мутагеном, например, УФ-излучением, в концентрации, немного ниже той, для которой проявляется ингибирование роста, как описано в примере 14. Культуры инкубируют в темноте при 28°C. Через 14 дней роста каллюс переносят в свежую среду такого же состава. Пересевают только культуры, имеющие необходимую эмбрионную морфологию, известную как морфология типа II хрупкого эмбрионного каллюса. Культуры размножают путем пересева с недельными интервалами, пересевая от двух до десяти раз в свежую среду, причем пересевают только наиболее быстро растущие культуры. Затем быстро растущий каллюс переносят в среду для поддержания каллюса, содержащую ингибирующий протокс гербицид в требуемой концентрации, как описано в примере 11. Если каллюс растет хорошо при этой концентрации, обычно после приблизительно пятидесяти еженедельных пересевов каллюс переносят в среду для поддержания каллюса, содержащую в три раза более высокую концентрацию ингибитора, и продолжают пересевание до получения хорошо растущей культуры. Это процесс повторяют, применяя среду, содержащую ингибитор протокса в концентрации, в 10 раз превышающей начальную пригодную концентрацию, а затем среды, содержащие в 20 и в 40 раз более высокие концентрации.

Когда получено достаточное количество каллюса, его переносят в среду для регенерации, пригодную для созревания эмбриона и регенерации растения. Эмбрионный каллюс, растущий при каждой из исследованных концентраций гербицида, переносят в среду для регенерации.

б) Селекция с применением эмбриогенных суспензионных культур

Эмбриогенные суспензионные культуры инбредной линии 2717 кукурузы Funk создают аналогично методике из примера 24 и поддерживают путем пересева с недельными интервалами в свежую жидкую среду N6, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л. Для увеличения частоты мутаций, толерантных к гербициду, культуры в это время могут быть обработаны химическим мутагеном, например, этилметансульфонатом в концентрации, немного ниже той, при которой проявляется ингибирование роста, как это указано в примере 14. Для селекции культуры переносят в жидкую среду N6, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л и ингибитор протокса в концентрации, достаточной для замедления роста, но которая не оказывает вредного воздействия на эмбриогенность культуры. Культуры выращивают на шейкере при 120об/мин при 28°C в темноте. С недельными интервалами среду удаляют и добавляют свежую. Культуры разбавляют средой для культивирования в соответствии с их ростом так, чтобы поддерживать концентрацию, равную приблизительно 10мл объема упакованных клеток в 50мл среды. При каждом пересевании культуры обследуют и сохраняют для дальнейшего культивирования только быстро растущие культуры с необходимой рыхлой эмбриогенной морфологией. После двух-десяти пересевов в среду, содержащую N6, культуры увеличиваются в объеме, по крайней мере, в два-три раза после каждого еженедельного пересева.

Затем культуры переносят в среду N6, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л и дозу ингибитора, в три раза более высокую, чем та, которая применялась первоначально. Растущие культуры повторно пересевают в эту среду еще два-десять раз, как описано выше. Для дальнейшего пересева отбирают быстро растущие культуры с необходимой рыхлой эмбриогенной морфологией. Затем быстро растущие культуры переносят в среду N6, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л и дозу ингибитора, в десять раз более высокую, чем та, которая применялась первоначально, и процесс пересева растущих культур с требуемой рыхлой эмбриогенной морфологией повторяют от двух до десяти раз до тех пор, пока не будут получены быстро растущие культуры. Затем эти культуры переносят в среду N6, содержащую 2,4-Д в концентрации 2мг/л и дозу ингибитора, в тридцать раз более высокую, чем та, которая применялась первоначально.

Для регенерации растений из каждой из эмбриогенных суспензионных культур, селекционированных определенным уровнем концентрации гербицида, культуры сначала переносят в среду N6, отвержденную с помощью Gelrite® и содержащую 2,4-Д в концентрации 2 мг/л и необязательно ингибитор в концентрации, при которой выращивали культуры, для получения эмбриогенного каллюса. Эмбриогенный каллюс пересевают в свежую среду для поддержания каллюса до тех пор, пока не будет получено необходимое для регенерации количество каллюса. Пересевают только культуры с требуемой рыхлой эмбриогенной морфологией.

Пример 19: Регенерация растений кукурузы из селекционированных каллюсных или суспензионных культур

Растения регенерируют из селекционированных культур эмбриогенного каллюса, полученных аналогично примеру 13, путем переноса в свежую среду для регенерации. Применяемыми средами для регенерации являются: среда N60, состоящая из среды N6, в которой отсутствует 2,4-Д, либо N61, состоящая из среды N6, содержащей 2,4-Д в концентрации 0,25мг/л и кинетин (6-Фурфуриламинопурин) в концентрации 10мг/л, либо N62, состоящая из среды N6, содержащей 2,4-Д в концентрации 0,1мг/л и кинетин в концентрации 1мг/л, все отверждаемые с помощью 0,24%-ного Gelrite®. Культуры выращивают при 28°C на свету (освещение белыми флуоресцентными лампами, дающими 10-100 мкэйнштейнов/м с в течение 16 часов в день). Культуры пересевают в свежую среду каждые две недели. Проростки образуются на 3-8 неделях. Проростки высотой, по крайней мере, 2см отделяют из прилипшего каллюса и переносят в среду, стимулирующую рост корней. Используют различные стимулирующие рост корней среды. Среда состоит из среды N6 или MS, в которой отсутствуют витамины и в которой содержится либо обычная концентрация солей, либо концентрация солей уменьшена наполовину, концентрация сахарозы уменьшена до 1г/л и, кроме того, могут либо отсутствовать рострегулирующие соединения либо содержаться  $\alpha$ -нафталинуксусная кислота в концентрации 0,1мг/л. Когда корни разовьются в достаточной мере, проростки переносят в смесь для горшечных культур, состоящую из вермикулита, мохового торфа и садовой почвы. При трансплантации весь оставшийся каллюс удаляют, весь агар смывают, и листья обрезают наполовину. Проростки выращивают в теплице сначала закрытыми на несколько дней перевернутыми пластмассовыми чашками для сохранения влажности и выращивания в условиях затенения. После акклиматизации растения пересаживают в цветочные горшки и выращивают до созревания. Применяют удобрение Peters 20-20-20 (фирма Grace Sierra) для развития здоровых растений. После зацветания растения опыляют, предпочтительно путем самоопыления.

Пример 20: Конструирование векторов трансформации растения

Для трансформации растения пригодны многие векторы трансформации, а гены по изобретению могут быть использованы в сочетании с любым из таких векторов. Выбор вектора для применения будет зависеть от предпочтительного способа трансформации и вида-мишени для трансформации. Для определенных видов-мишеней могут быть предпочтительны различные антибиотические или селективные в отношении гербицида маркеры. Маркеры селекции, обычно применяемые при трансформации, включают ген *prtII*, который придает устойчивость к канамицину и родственным антибиотикам (Messing & Yierra, Gene, 19: 259-268 (1982); Bevan и др., Nature 304: 184-187 (1983)), ген *bar*, который придает устойчивость к гербициду фосфинтрицину (White и др., Nucl. Acids Res., 18: 1062 (1990), Spencer и др., Theor. Appl. Genet, 79: 625-631 (1990)), ген *hph*, который придает устойчивость к антибиотику гигромицину (Blochinger & Diggelmann, Mol. Cell Biol., 4: 2929-2931) и ген *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Bourouis и др., EMBO J., 2(7): 1099-1104 (1983)).

(1) Конструирование векторов, пригодных для трансформации *Agrobacterium*

Для трансформации с применением *Agrobacterium tumefaciens* пригодны многие векторы. Они обычно несут,

по крайней мере, одну пограничную последовательность Т-ДНК и включают такие векторы, как pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res., (1984)). Ниже описано конструирование двух типичных векторов.

#### Конструирование векторов pCIB200 и pCIB2001

Бинарные векторы pCIB200 и pCIB2001 используют для конструирования рекомбинантных векторов с применением *Agrobacterium* и их конструировали следующим образом. pTJS75kan создавали путем разложения pTJS75 (Schmidhauser & Helinski, J. Bacteriol., 164: 446-455 (1985)) с помощью NarI, позволяющей вырезать ген устойчивости к тетрациклину, с последующей инсерцией фрагмента AclI из pUC4K, несущей NPTII (Messing & Vierra, Gene, 19: 259-268 (1982); Bevan и др., Nature, 304: 184-187 (1983); McBride и др., Plant Molecular Biology, 14: 266-276, (1990)). Линкеры XhoI лидировали с EcoRV-фрагментом плазмиды pCIB7, содержащим левую и правую границы Т-ДНК, селективируемый в растении химерный ген pos/nptII и полилинкер pUC (Rothstein и др., Gene, 53: 153-161 (1987)), и клонировали фрагмент, разложенный с помощью XhoI, в pTJS75, разложенном с помощью Sall, для создания pCIB200 (см. также европейскую заявку EP 0332104, пример 19 [1338]). pCIB200 содержит следующие уникальные полилинкерные сайты рестрикции: EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI и Sall. pCIB2001 представляет собой производное от pCIB200, которое создано путем встраивания в полилинкер дополнительных сайтов рестрикции. Уникальными сайтами рестрикции в полилинкере pCIB2001 являются EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI, Sall, MluI, BsiI, AvrII, ApaI, HpaI и StuI. В дополнение к тому, что pCIB2001 содержит эти уникальные сайты рестрикции, он также имеет избирательность по отношению к канамицину в растениях и бактериях, левую и правую границы Т-ДНК для трансформации, обусловленной *Agrobacterium*, функцию trfA, имеющую происхождение из RK2, для мобилизации между *E.coli* и другими хозяевами, и функции OriT и OriV, также имеющие происхождение из RK2. Полилинкер pCIB2001 пригоден для клонирования полигенных экспрессирующих кластеров, содержащих их собственные регуляторные сигналы.

#### Конструирование pCIB10 и ее производных на основе селекции гигромицином

Бинарный вектор pCIB10 содержит ген, кодирующий устойчивость к канамицину для селекции в растениях, правую и левую пограничные последовательности Т-ДНК и включает последовательности из плазмиды pRK252 с широким спектром хозяев, что позволяет осуществлять репликацию как в *E.coli*, так и в *Agrobacterium*. Его конструкция описана у Rothstein и др., Gene, 53: 153-161, (1987)), Были сконструированы различные производные pCIB10, которые включают ген устойчивости к гигромицин-В-фосфотрансферазе, описанные у Gritz и др., Gene, 25: 179-188, (1983)). Эти производные дают возможность осуществлять селекцию клеток трансгенных растений либо только по устойчивости к гигромицину, либо по устойчивости к гигромицину и канамицину (pCIB715, pCIB717) (Rothstein и др., Gene, 53: 153-161, (1987)).

#### (2) Конструирование векторов, пригодных для трансформации без использования *Agrobacterium*.

Трансформация без использования *Agrobacterium* дает возможность обойти требование наличия последовательностей Т-ДНК в выбранном векторе трансформации, и, следовательно, векторы, в которых отсутствуют эти последовательности, могут быть использованы в дополнение к векторам, таким, как описанные выше и которые содержат последовательности Т-ДНК. Способы трансформации, которые не основаны на использовании *Agrobacterium*, включают трансформацию с помощью бомбардировки частицами, поглощение протопласта (например, с помощью ПЭГ и электропорации) и микроинъекцию. Выбор вектора в значительной степени зависит от предпочтительного выбора трансформируемых видов. Ниже описаны конструкции некоторых типичных векторов.

#### Конструирование pCIB3064

pCIB3064 представляет собой вектор, имеющий происхождение из pUC и пригодный для методов прямого переноса гена в сочетании с селекцией гербицидом basta (или фосфинотрицином). Плазмида pCIB246 включает промотор 35S CaMV, действенным образом сплитый с геном GUS *E.coli*, и терминатор транскрипции 35S CaMV, и она описана в заявке WO 93/07278. Промотор 35S этого вектора содержит два кодона ATG 5' последовательности в сайте инициации. Эти сайты подвергали мутации с использованием стандартных ПЦР-методик таким образом, чтобы удалить кодоны ATG и образовать сайты рестрикции SspI и PvuII. Новые сайты рестрикции находились на расстоянии 96 и 37 пар оснований от уникального сайта Sall и на расстоянии 101 и 42 пар оснований от действительного сайта инициации. Полученное производное pCIB246 обозначили как pCIB3025. Затем ген GUS вырезали из pCIB3025 путем разложения с помощью Sall и Sad, концы "затупляли" и повторно лигировали для образования плазмиды pCIB3060. Плазмида pJIT82 была получена из John Innes Center, Norwich, и из нее вырезали фрагмент SmaI длиной 400 пар оснований, содержащий ген bar из *Streptomyces viridochromogenes*, и встраивали в сайт HpaI плазмиды pCIB3060 (Thompson и др., EMBO J., 6: 2519-2523, (1987)). Это позволяло получить плазмиду pCIB3064, содержащую ген bar, находящийся под контролем промотора 35S CamV и терминатора для селекции гербицидом, ген fro устойчивости к ампициллину (для селекции в *E.coli*) и полилинкер с уникальными сайтами SphI, PstI, HindIII и BamHI. Этот вектор пригоден для клонирования полигенных экспрессирующих кластеров растения, содержащих их собственные регуляторные сигналы.

#### Конструирование PSOG19 и dSOG35

pSOG35 представляет собой вектор трансформации, который использует дигидрофолат-редуктазу (DHFR) *E.coli* в качестве селективируемого маркера, придающего устойчивость к метотрексату. Применяли ПЦР для амплификации промотора 35S (~800 пар оснований), интрона 6 из гена кукурузы Adh1 (~550 пар оснований) (Lou и др., Plant J., 3: 393-403, 1993; Dennis и др., Nucl. Acids Res., 12: 3983-4000, 1984) и 18 пар оснований нетранслируемой лидерной последовательности GUS из плазмиды pSOG10. Фрагмент длиной 250 пар оснований, кодирующий ген дигидрофолат-редуктазы типа II из *E.coli*, также амплифицировали с помощью ПЦР

и эти два ПЦР-фрагмента соединяли с фрагментом SacI-PstI из pBI221 (фирма Clontech), содержащим основной вектор pUC19 и терминатор нопалин-синтазы. Сборка этих фрагментов давала плазмиду pSOG19, содержащую промотор 35S, слитый с последовательностью интрона 6, лидером GUS, геном DHFR и терминатором нопалин-синтазы. Замена лидера GUS в pSOG19 на лидерную последовательность из вируса хлоротической пятнистости кукурузы (MCMV) давала вектор pSOG35. pSOG19 и pSOG35 несут ген pUC резистентности к ампициллину и имеют сайты HindIII, SphI, PstI и EcoRI, пригодные для клонирования чужеродных последовательностей.

pSOG10

Данный вектор экспрессии В-глюкуронидазы (GUS) получали из плазмиды pBI121, поставляемой фирмой Clontech Laboratories, Palo Alto, California. Интрон 6 гена Adh1 кукурузы амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды pB428, описанной у Beimetzen и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 4125-4128, (1987), с применением олигонуклеотидных праймеров SON0003 и SON0004:

SON0003: 5'-CTCGGATCCAGCAGATTTCGAAGAAGGTACAG-3',

SON0004: 5'-ACGGGATCCAACTTCCTAGCTGAAAAATGGG-3'.

Продукт ПЦР-реакции разлагали с помощью рестрикционной эндонуклеазы BamHI, расщепляющей сайт BamHI, добавленный на 5'-конце каждого ПЦР-праймера. Полученный фрагмент ДНК очищали на агарозном геле и лигировали в сайт BamHI плазмиды pBI121, который находится между промотором CaMV35S и геном GUS. Лигированную ДНК трансформировали в E.coli и путем рестрикционного разложения идентифицировали клоны с интроном 6 Adh1 в той же ориентации, что и ген GUS.

pSOG19

Данный вектор экспрессии дигидрофолат-редуктазы (DHFR) получали путем слияния промотора 35S и интрона 6 гена Adh1 плазмиды pSOG10 с геном DHFR из плазмиды pHCO, описанной у Bourouis и Jarry, EMBO J., 2: 1099-1104, (1983). Промотор 35S и интрон 6 гена Adh1 получали путем ПЦР-амплификации фрагмента из плазмиды pSOG10 с использованием праймеров SON0031 и SON0010:

SON0031: 5'-CATGAGGGACTGACCACCCGGGGATC-3',

SON0010: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'.

Полученные фрагменты разлагали с помощью рестрикционных эндонуклеаз PstI и BspHI и очищали на агарозном геле.

Кодирующие области DHFR получали с помощью ПЦР-амплификации pHCO с использованием праймеров SON0016 и SON0017;

SON0016: 5'-GCTACCATGGCCACATAGAACACC-3',

SON0017: 5'-CGAGAGCTCGCACTTCAACCTTG-3'.

Полученный фрагмент разлагали с помощью рестрикционных эндонуклеаз NcoI и Sad и очищали на агарозном геле.

Два описанных выше фрагмента лигировали в фрагменте вектора, полученного из плазмиды pBI121 путем разложения с помощью рестрикционных эндонуклеаз PstI и SacI и очистки на агарозном геле фрагмента длиной 3 т.п.н., содержащего область терминатора Nos и область pUC19 плазмиды pBI121. Это тройное лигирование позволило слить промотор 35S, интрон 6 Adh1, ген DGFR и терминатор Nos в правильном порядке и ориентации для функциональной экспрессии в растениях.

PSOG20

Данный вектор экспрессии GUS получали из pSOG10 путем инсерции лидера вируса хлоротической пятнистости кукурузы (MCMV), описанного у Lommel и др., Virology, 181: 382-385 (1991), в нетранслируемую лидерную последовательность гена 35S-GUS с помощью тройного лигирования.

Синтезировали и отжигали обе цепочки лидерной последовательности капсидного протеина MCMV длиной 17 пар оснований плюс соответствующие сайты эндонуклеазной рестрикции. Полученный двухцепочечный фрагмент разлагали с помощью BamHI и NcoI и очищали на акриламидном геле.

Кодирующую область гена GUS амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров SON0039 и SON0041 и плазмиды pBI121 в качестве матрицы:

SON0039: 5'-CGACATGGTACGTCTGTAGAAACCCACA-3',

SON0041: 5'-ATCGCAAGACCGGCAACAGGATTTC-3'.

Эти праймеры добавляли сайт NcoI к 5'-концу GUS и сайт SacI к 3'-концу GUS. Полученный фрагмент разлагали с помощью рестрикционных эндонуклеаз NcoI и SacI и очищали на агарозном геле.

Ген GUS удаляли из плазмиды pSOG10 путем разложения рестрикционной эндонуклеазой SacI и частичного разложения рестрикционной эндонуклеазой BamHI. Полученный вектор, который имел сайт BamHI и сайт SacI, в который повторно встраивают кодирующую область за промотором 35S-интроном 6 Adh1, очищали на агарозном геле.

Описанные выше три фрагмента лигировали путем тройного лигирования для получения гибридного гена, имеющего структуру: промотор 35S-интрон 6 Adh1-лидерная последовательность MCMV-GUS-терминатор Nos, все на основе вектора pUC19.

pSOG35

DGFR-селектируемый вектор-маркер идентичен pUC19, за исключением того, что MCMV-лидера встраивают в нетранслируемый лидер гена DGFR для усиления трансляции. Эту операцию осуществляли в две стадии. Сначала кодирующую область гена GUS в pSOG32, векторе, идентичном pSOG30, за исключением того, что он чаще содержит модифицированный промотор Adh, чем 35S, замещали кодирующей областью DGFR из pUC19 путем эксцизии GUS с помощью NcoI и SacI и лигирования в DGFR в виде NcoI-SacI-фрагмента. Это привело к

получению вектора pSOG33, который имеет генную структуру: промотор Adh-интрон 6 Adh1-лидерная последовательность MCMV-кодирующая область DGFR-терминатор Nos с сайтом BglI между промотором и интроном и с сайтом SacI между кодирующей областью и терминатором. Фрагмент NcoI-SacI выделяли с помощью разложения рестрикционной эндонуклеазой и очистки на агарозном геле и лигировали в сайты BamHI и SacI вектора pSOG30, замещая гибридную структуру интрон 6 Adh1-лидерная последовательность MCMV-кодирующая область GUS вектора pSOG30 на структуру интрон 6 Adh1-лидерная последовательность MCMV-кодирующая область DGFR вектора pSOG33.

Пример 21: Конструирование полигенных экспрессирующих кластеров растений

Генные последовательности, предназначенные для экспрессии в трансгенных растениях, сначала объединяют в полигенные экспрессирующие кластеры за пригодным промотором и в обратном направлении по отношению к пригодному терминатору транскрипции. Эти полигенные экспрессирующие кластеры затем легко могут быть перенесены в векторы трансформации растений, описанные выше в примере 19.

Выбор промотора

Выбор промотора, используемого в полигенных экспрессирующих кластерах, будет определять пространственную и временную схему экспрессии трансгена в трансгенном растении. Выбранные промоторы будут экспрессировать трансгены в определенных типах клеток (таких, как эпидермальные клетки листа, мезофильные клетки, клетки коры корня) или в определенных тканях или органах (например, в корнях, листьях или цветках), и этот выбор должен отражать требуемую локализацию экспрессии трансгена. В другом варианте выбранный промотор может стимулировать экспрессию гена под воздействием индуцируемого светом или регулируемого другими временными параметрами промотора. Еще одним альтернативным вариантом является таковой, когда выбранный промотор представляет собой промотор, регулируемый химическими агентами. Это будет обеспечивать возможность индуцировать экспрессию трансгена только тогда, когда требуется, и вызывать ее путем обработки химическим индуцирующим агентом.

Терминаторы транскрипции

Широкое разнообразие терминаторов транскрипции доступно для применения в полигенных экспрессирующих кластерах. Они ответственны за прекращение транскрипции позади трансгена и его правильное полиаденилирование. Соответствующие терминаторы транскрипции и те, которые, как известно, обладают способностью функционировать в растениях, включают терминатор 35S CaMV, терминатор tm1, терминатор нопалин-синтаза, терминатор E9 gbcS гороха. Они могут применяться как в однодольных, так и в двудольных растениях.

Последовательности для усиления или регулирования экспрессии

Были обнаружены многочисленные последовательности, усиливающие экспрессию гена внутри единицы транскрипции, и эти последовательности могут применяться в сочетании с генами по изобретению для усиления их экспрессии в трансгенных растениях.

Было установлено, что различные интронные последовательности усиливают экспрессию, в частности в клетках однодольных растений. Например, обнаружено, что интроны гена Adh1 кукурузы значительно усиливают экспрессию гена дикого типа под воздействием родственного промотора при введении в клетки кукурузы. Было установлено, что интрон 1 является особенно эффективным и усиливает экспрессию в гибридных конструкциях с геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Callis и др., Genes Develop. 1: 1183-1200 (1987)). В этой же экспериментальной системе интрон гена bronzel кукурузы обладал подобным действием в отношении усиления экспрессии (Callis и др., см. выше). В соответствии с принятой практикой интронные последовательности включали в векторы трансформации растения обычно внутри нетранслируемой лидерной последовательности.

Также известны многочисленные нетранслируемые лидерные последовательности, усиливающие экспрессию и имеющие происхождение из вирусов, и они являются особенно эффективными в клетках двудольных растений. В частности, было подтверждено, что лидерные последовательности из вируса мозаики табака (TMV, "W-последовательность"), из вируса хлоротической пятнистости кукурузы (MCMV) и из вируса мозаики люцерны (AMV) эффективны для усиления экспрессии (см. например, у Gallie и др. Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski и др., Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)).

Ориентация генного продукта внутри клетки

Известны различные существующие в растениях механизмы для ориентации генных продуктов, а последовательности, контролирующее функционирование этих механизмов, охарактеризованы достаточно подробно. Например, ориентация генных продуктов к хлоропласту контролируется с помощью сигнальной последовательности, которая обнаружена на содержащем аминокислотную группу конце различных протеинов и которую отщепляют во время импорта в хлоропласт, получая зрелый протеин (см., например, у Comai и др., J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Эти сигнальные последовательности могут быть слиты с гетерологичными генными продуктами для осуществления импорта гетерологичных продуктов в хлоропласт (van den Broeck и др., Nature 313: 358-363 (1985)). ДНК, кодирующая соответствующие сигнальные последовательности, может быть выделена из 5'-конца кДНК, кодирующих протеин RUBISCO, протеин CAB, фермент EPSP-синтазу, протеин GS2 и целый ряд других протеинов, для которых известно, что они локализованы в хлоропласте.

Другие генные продукты локализованы в других органеллах, таких, как митохондрия и пероксисома (см., например, у Unger и др., Plant Molec. Biol. 13: 411-418 (1989)). кДНК, кодирующие эти продукты, также могут быть подвергнуты манипуляциям для осуществления ориентации гетерологичных генных продуктов в эти органеллы. Примерами таких последовательностей являются кодируемые в ядре АТФазы и специфичные для митохондрий изоформы аспаратамино-трансферазы. Ориентация к клеточным протеиновым тельцам была

описана у Rogers и др., в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-6516 (1985)).

Кроме того, были охарактеризованы, последовательности, приводящие к ориентации генных продуктов к другим клеточным компартментам. Последовательности с концевой аминогруппой ответственны за ориентацию к эндоплазматическому ретикулуму (ЭР), апопласту, и за экстраклеточную секрецию из алейронных клеток (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769-783 (1990)). Кроме того, последовательности с концевой аминогруппой в сочетании с последовательностями с концевой карбоксильной группой ответственны за ориентацию генных продуктов к вакуолям (Shinshi и др., Plant Molec. Biol. 14: 357-368 (1990)).

Путем слияния описанных выше соответствующих ориентирующих последовательностей с представляющими интерес трансгенными последовательностями возможно направлять трансгенный продукт к любой органелле или к любому компартменту клетки. Для ориентации, например, в хлоропласт сигнальную последовательность хлоропласта из гена RUBISCO, гена CAB, гена EPSP-синтазы или гена GS2 сливают в рамке с аминоконцевым кодоном ATG трансгена. Выбранная сигнальная последовательность должна включать известный сайт расщепления, а при конструировании гибридов следует учитывать любые аминокислоты после сайта расщепления, которые необходимы для расщепления. В некоторых случаях это требование может быть удовлетворено путем добавления небольшого количества аминокислот между сайтом расщепления и ATG трансгена или в альтернативном варианте путем замещения нескольких аминокислот внутри трансгенной последовательности. Гибриды, сконструированные для импорта в хлоропласт, могут быть оценены на эффективность поглощения хлоропластом путем трансляции *in vitro* транскрибируемых *in vitro* конструкций с последующем поглощением *in vitro* хлоропластом с использованием методов, описанных у Bartlett и др. (Edelmann и др. (ред.) Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier, стр.1081-1091 (1982)); Wasmann и др. (Mol. Gen. Genet. 205: 446-453 (1986)). Эти методы конструирования хорошо известны в данной области техники и одинаково пригодны и для митохондрий, и для пероксисом. Выбор ориентации, которая может требоваться для экспрессии трансгенов, будет зависеть от клеточной локализации предшественника, необходимого в качестве исходной точки для данного процесса. Эта локализация обычно бывает цитозольной или хлоропластной, хотя в некоторых случаях может быть митохондриальной или пероксисомальной. Обычно не требуется, чтобы продукты экспрессии трансгена были ориентированы к ЭР, апопласту или вакуоли.

Вышеописанные механизмы для клеточной ориентации могут быть использованы не только в сочетании с их родственными промоторами, но также в сочетании с гетерологичными промоторами так, чтобы обеспечивать специфическую клеточную ориентацию к месту назначения под регуляцией транскрипции промотором, который имеет схему экспрессии, отличную от таковой у промотора, который стимулирует ориентацию сигнала.

Пример 22: Трансформация двудольных растений

Методы трансформации для двудольных растений хорошо известны в данной области техники и включают как таковые, основанные на применении *Agrobacterium*, так и методы, для которых не требуется использовать *Agrobacterium*. Методы, для которых не требуются *Agrobacterium*, включают поглощение экзогенного генетического материала непосредственно протопластами или клетками. Это может осуществляться с помощью ПЭГ или медируемого электропорацией поглощения, доставки, медируемой бомбардировкой частицами, или путем микроинъекции. Примеры этих методов описаны у Paszkowski и др., EMBO J. 3:2717-2722 (1984), Potrykus и др., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich и др., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986) и у Klein и др., Nature 327: 70-73 (1987). В каждом случае трансформированные клетки регенерируют до целых растений, используя стандартные методы, известные в данной области техники.

Трансформация, медируемая *Agrobacterium*, является предпочтительным методом для трансформации двудольных вследствие высокой эффективности этой трансформации и ее широкой применимости для различных многочисленных видов. Многие культурные виды, которые обычно могут трансформироваться с помощью *Agrobacterium*, включают табак, томаты, подсолнечник, хлопчатник, масличный рапс, картофель, сою, люцерну и тополь (EP 0317511 (хлопчатник), EP 0249432 (томаты, на имя фирмы Calgene), WO 87/07299 (Brassica, на имя фирмы Calgene), патент США 4795855 (тополь)). Трансформация с использованием *Agrobacterium* обычно включает перенос бинарного вектора, несущего чужеродную, представляющую интерес ДНК (например, pCIB200 или pCIB2001), в соответствующий штамм *Agrobacterium*, который может зависеть от комплемента генов *vir*, которые несет штамм-хозяин *Agrobacterium*, либо на ко-резидентной Ti-плазмиде, либо хромосомально (например, в штамм CIB542 для pCIB200 и pCIB2001) (Uknes и др., Plant Cell 5: 159-169 (1993)). Перенос рекомбинантного бинарного вектора в *Agrobacterium* осуществляют методом трехродительского (трехродительского) скрещивания с использованием *E.coli*, несущей рекомбинантный бинарный вектор, штамм-хелпер *E.coli*, который несет такую плазмиду, как pRK2013, и который способен передавать рекомбинантный бинарный вектор в штамм-мишень *Agrobacterium*. В другом варианте рекомбинантный бинарный вектор может быть перенесен в *Agrobacterium* путем трансформации ДНК (Höfgen & Willmitzer, Nucl. Acid. Res. 16: 9877 (1988)).

Трансформация видов растений-мишеней рекомбинантной *Agrobacterium* обычно включает совместное культивирование *Agrobacterium* с эксплантатами из растения и осуществляется в соответствии с протоколами, хорошо известными в данной области техники. Трансформированную ткань регенерируют на селективируемой среде, несущей маркер устойчивости к антибиотику или гербициду, находящийся между границами бинарной плазмиды T-ДНК.

Пример 23: Трансформация однодольных растений

Трансформация большинства видов однодольных растений в настоящее время также стала традиционной. Предпочтительные методы включают непосредственный перенос гена в протопласты с использованием ПЭГ или электропорацию и бомбардировку частицами ткани каллуса. Трансформации могут быть осуществлены с

одиночными видами ДНК или со множественными видами ДНК (т.е. путем котрансформации), и оба эти метода пригодны для использования по настоящему изобретению. Котрансформация может иметь то преимущество, что она позволяет избежать необходимости применения сложной векторной конструкции и дает возможность генерировать трансгенные растения с несцепленными локусами для представляющего интерес гена и селективируемого маркера, давая возможность удалить селективируемый маркер в последующих поколениях, если это считается необходимым. Однако недостатком при применении котрансформации является частота, составляющая менее 100%, с которой отдельные виды ДНК интегрируются в геном (Schocher и др. *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

В описаниях европейских заявок EP 0292435 (на имя фирмы Ciba-Geigy), EP 0392225 (на имя фирмы Ciba-Geigy) и WO 93/072778 (на имя фирмы Ciba-Geigy) приведены способы получения каллюса и протопластов из элитной инбредной линии кукурузы, трансформации протопластов с использованием ПЭГ или электропорации и регенерации растений кукурузы из трансформированных протопластов. Gordon-Kamm и др. в *Plant Cell* 2: 603-618 (1990) и Fromm и др. в *Biotechnology* 8: 833-839 (1990) опубликовали способы трансформации линии кукурузы, имеющей происхождение из A188, с использованием бомбардировки частицами. Кроме того, в международной заявке WO 93/07278 (на имя фирмы Ciba-Geigy) и у Koziel и др. в *Biotechnology* 11: 194-200 (1993) описаны способы трансформации элитных инбредных линий кукурузы путем бомбардировки частицами. Этот способ включает использование незрелых эмбрионов кукурузы длиной 1,5-2,5мм, вырезанных из початка через 14-15 дней после опыления, и устройств для бомбардировки типа PDS-1000He Biolistics.

Трансформация риса также может быть осуществлена с использованием методов непосредственного переноса гена с применением протопластов или бомбардировки частицами. Медируемая протопластом трансформация описана для японских и индийских типов риса (Zhang и др., *Plant Cell Rep.* 7: 379-384 (1988); Shimamoto и др., *Nature* 338: 274-277 (1989); Datta и др., *Biotechnology* 8: 736-740 (1990)). Оба типа также трансформируют стандартными методами с использованием бомбардировки частицами (Christou и др., *Biotechnology* 9: 957-962 (1991)).

В европейской заявке EP 0332581 (на имя фирмы Ciba-Geigy) описаны методы получения, трансформации и регенерации протопластов растений семейства мятликовых (Poideae). Эти методы дают возможность трансформировать ежу (*Dactylis* spp.) и пшеницу. Кроме того, трансформация пшеницы описана у Vasil и др., *Biotechnology* 10: 667-674 (1992), с использованием бомбардировки частицами в клетках типа С каллюса с продолжительным временем регенерации, а также у Vasil и др., *Biotechnology* 11: 1553-1558 (1993) и у Weeks и др., в *Plant Physiol.* 102: 1077-1084 (1993) с использованием бомбардировки частицами незрелых эмбрионов и незрелого каллюса эмбрионального происхождения. Однако предпочтительный метод для трансформации пшеницы включает трансформацию пшеницы путем бомбардировки частицами незрелых эмбрионов и включает либо стадию высокого содержания сахарозы или высокого содержания мальтозы, предшествующую доставке гена. До бомбардировки любое количество эмбрионов (длиной 0,75-1мм) помещают в MS-среду с добавлением 3%-ной сахарозы (Murashige & Skoog, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) и 3мг/л 2,4-Д для индукции соматических эмбрионов, что дает им возможность развиваться в темноте. В выбранный день бомбардировки эмбрионы удаляют из среды для индукции и помещают в осмотикум (т.е. в среду для индукции с добавлением сахарозы или мальтозы в требуемой концентрации, обычно 15%-ной). Эмбрионам дают возможность пройти плазмолиз в течение 2-3-ч и затем подвергают бомбардировке. В одной чашке-мишени обычно используют по 20 эмбрионов, хотя это количество не имеет решающего значения. Соответствующую несущую ген плазмиду (такую, как pCIB3064 или pSOG35) осаждают на золотые частицы размером порядка микрометра, используя стандартную методику. Каждую чашку с эмбрионами обстреливают с помощью устройства Biolistics на основе гелия фирмы DuPont с использованием давления залпа -1000фунтов/кв.дюйм и стандартного экрана с размером пор 80меш. После бомбардировки эмбрионы помещают обратно в темноту для восстановления в течение приблизительно 24ч (все еще в осмотикуме). Через 24ч эмбрионы удаляют из осмотикума и помещают назад в среду для индукции, где они остаются в течение приблизительно месяца до регенерации. Приблизительно через один месяц эксплантаты эмбрионов с развитым эмбрионным каллюсом переносят в среду для регенерации (MS+1мг/л NAA ( $\alpha$ -нафтилуксусная кислота), 5мг/л GA), содержащую, кроме того, соответствующий селективирующий агент (10мг/л басты в случае pCIB3064 и 2мг/л метотрексата в случае pSOG35). Через приблизительно один месяц развившиеся ростки переносят в более крупные стерильные контейнеры, известные, как "GA7", содержащие MS с половинной крепостью, 2%-ную сахарозу и такую же концентрацию селективирующего агента. В заявке на патент 08/147161 приведены методы трансформации пшеницы, и эта заявка включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Пример 24: Селекция генов протокса растений на устойчивость к ингибирующим протоке гербицидам в системе экспрессии *E.coli*

Плазмиду pWDC-4, кодирующую хлоропластами фермент протоке кукурузы, трансформируют в подвергнутом неспецифическому мутагенезу штамме XLI-Red (фирма Strategene, La Jolla, Ca). Трансформант высевает в L-среду, содержащую 50г/мл ампициллина, и инкубируют в течение 48 часов при 37°C. Газоны трансформированных клеток экспортируют из чашек и получают ДНК плазмиды, используя набор Wizard Мегаргер (фирма Promega, Madison, WI). ДНК плазмиды, выделенную из этого штамма-мутатора, вероятно, содержит приблизительно одно случайным образом измененное основание на 2000 нуклеотидов (см. Greener и др., *Strategies* 7(2): 32-34 (1994)).

Мутированную плазмидную ДНК переносят в мутант hemG SASX38 (Sasarman и др., *J.Gen. Microbiol.* 113: 297 (1979) и высевает в L-среду, содержащую 100г/мл ампициллина, и в такую же среду, содержащую

различные концентрации ингибирующего протоке гербицида. Чашки инкубируют в течение 2-3 дней при 37°C. ДНК плазмиды выделяют из всех колоний, растущих в присутствии концентраций гербицида, которые эффективно вызывают гибель штамма дикого типа. Затем выделенную ДНК переносят в SASX38 и вновь высевают в среду с гербицидом для гарантии того, что эта устойчивость обусловлена плазмидой.

Мутированную ДНК плазмиды pWDC-4 вновь выделяют из устойчивых колоний и вырезают кодирующую протоке последовательность путем разложения с помощью EcoRI и XhoI. Затем вырезанную кодирующую протоке последовательность повторно клонируют в неподвергаутом мутагенезу векторе pBluescript и повторно тестируют на устойчивость к ингибирующему протоке гербициду таким же образом, как описано выше.

Этот процесс удаляет мутации некодирующей последовательности, которые обуславливают устойчивость, например, положительных мутантов (т.е. мутантов, устойчивость которых является следствием мутаций, вызывающих повышенную экспрессию немодифицированного протокса), и оставляет только тех мутантов, устойчивость которых является следствием мутаций в кодирующей последовательности протокса. Определяют последовательность ДНК, идентифицированную с помощью этого процесса, для всех вероятных толерантных к гербициду генов протокса и выявляют мутации путем сравнения с последовательностью протокса дикого типа в pWDC-4,

С использованием описанной выше методики были идентифицированы мутации устойчивости, превращающие С в Т на нуклеотиде в положении 498 в последовательности в pWDC-4 (SEQ ID NO: 5). Плазмиду, несущую эту мутацию, обозначили как pMzC-1Val. Это изменение превращает кодон GCT аланина в аминокислоте в положении 166 (SEQ ID NO: 6) в кодон GTT валина и приводит к получению фермента протокса, который по крайней мере в 10 раз более устойчив к ингибирующему протоке гербициду в бактериальном тесте.

Плаزمида pMzC-1Val в векторе pBluescript SK для целей процедуры патентования была депонирована 30 сентября 1994г. под обозначением pWDC-8 в коллекции культур Службы сельскохозяйственных исследований, и она получила каталожный номер NRRL №21340.

Такую же стратегию применяли для скрининга устойчивых к гербициду форм гена Protox 1 Arabidopsis в различных векторах. Одна из модифицированных мутаций представляет собой замену С на Т в нуклеотиде в положении 689 в последовательности pWDC-2 (SEQ ID NO: 1); эту плазмиду обозначили как pAraC-1Val. Это идентично таковому в указанном выше мутанте pMzC-1Val, что ведет к превращению кодона GCT аланина в аминокислоте в положении 220 (SEQ ID NO: 2) в кодон GTT валина в соответствующем положении в последовательности протеина протокса Arabidopsis.

Второй ген устойчивости включает замену А на G в нуклеотиде в положении 1307 в последовательности pWDC-2 (SEQ ID NO: 1); эту плазмиду обозначили как pAraC-2Cys. Это изменение превращает кодон TAC тирозина в аминокислоте в положении 426 (SEQ ID NO: 2) в кодон TGC цистеина. Соответствующий кодон тирозина в последовательности protox 1 кукурузы в нуклеотиде в положении 1115-1117 (SEQ ID NO: 5; аминокислота в положении 372 последовательности SEQ ID NO: 6) может быть мутирован аналогичным образом для получения устойчивой к гербициду формы этого фермента.

Третий ген устойчивости имеет замену G на A в нуклеотиде в положении 691 в последовательности pWDC-2 (SEQ ID NO: 1); эту плазмиду обозначили как pAraC-3Ser. Это изменение превращает кодон GGT глицина в аминокислоте в положении 221 (SEQ ID NO: 2) в кодон AGT серина в положении кодона, соседнем к мутации в pAraC-1. Соответствующий кодон глицина в последовательности protox 1 кукурузы в нуклеотиде в положении 497-499 (SEQ ID NO: 5; аминокислота в положении 167 последовательности SEQ ID NO: 6) может быть мутирован аналогичным образом для получения устойчивой к гербициду формы этого фермента.

Все описанные выше мутации приводят к получению фермента протокса, который, по крайней мере, в 10 раз более устойчив к ингибирующему протоке гербициду в бактериальном тесте.

Плазмиды pAraC-2Cys в векторе pFL61 для целей процедуры патентования была депонирована 14 ноября 1994г. под обозначением pWDC-7 в коллекции культур Службы сельскохозяйственных исследований, и она получила каталожный номер NRRL №21339N.

Пример 25: Дополнительные замещения устойчивого к гербициду кодона в положениях, выявленных путем случайного скрининга

Аминокислоты, выявленные в качестве сайтов устойчивости к гербициду путем случайного скрининга, замещают другими аминокислотами и тестируют на функциональность и на толерантность к гербициду в бактериальной системе. Сайт-специфический мутагенез с использованием олигонуклеотидов последовательности Protox-1 Arabidopsis осуществляют, применяя набор Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (фирма Clontech, Palo Alto, CA). После подтверждения аминокислотных изменений путем анализа последовательности мутантные плазмиды переносят в штамм SASX38 и высевают в среду L-amp<sup>100</sup> для тестирования на функционирование и в различные концентрации ингибирующего протоке гербицида для тестирования на толерантность.

Эту методику применяли к кодону аланина в нуклеотидах 688-690 и к кодону тирозина в нуклеотидах 1306-1308 последовательности протокса Arabidopsis (SEQ ID NO: 1). Эти результаты показывают, что кодон аланина в нуклеотидах 688-690 может быть заменен на кодон валина, треонина, лейцина или цистеина, чтобы получить устойчивый к гербициду фермент протоке, который сохраняет свою функцию. Кроме того, эти результаты показывают, что кодон тирозина в нуклеотидах 1306-1308 может быть заменен на кодон цистеина, изолейцина, лейцина, валина или треонина с той целью, чтобы получить устойчивый к гербициду фермент протоке, который сохраняет свою функцию.

Пример 26: Демонстрация перекрестной толерантности мутаций устойчивости к различным соединениям, ингибирующим протокс

Устойчивые мутантные плазмиды, прошедшие селекцию на устойчивость к одному гербициду, тестируют в отношении спектра других ингибирующих протоке соединений. Штамм SASX38, содержащий плазмиду дикого типа, помещают в среду, содержащую определенный интервал концентраций каждого соединения для определения летальной концентрации каждого из них. Устойчивые мутантные плазмиды в SASX38 высевают и определяют способность выживать при концентрации каждого соединения, которая, по крайней мере, в 10 раз превышает концентрацию, являющуюся летальной для штамма SASX38, содержащего плазмиду дикого типа.

Результаты, полученные при определении перекрестной толерантности, показывают, что каждая из определенных мутаций обуславливает толерантность к различным ингибирующим протокс соединениям. В частности результаты показывают, что: 1) мутация AraC-1Val обуславливает устойчивость к ингибиторам протокса, включающим соединения формул IV, XI, XIII, XIV, XV и XVII, но не обязательно ограниченных ими; 2) мутация AraC-2Cys обуславливает устойчивость к ингибиторам протокса, включающим соединения формул XI, XIII, XV и XVII, но не обязательно ограниченных ими; 3) мутация MzC-1Val обуславливает устойчивость к ингибиторам протокса, включающим соединения формул XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI и XVII, но не обязательно ограниченных ими; 4) мутация rAraC-3Ser обуславливает устойчивость к ингибиторам протокса, включающим бифенокс и соединения формул IV, XII, XIII, XIV, XV и XVII, но не обязательно ограниченных ими.

Пример 27: Получение толерантных к гербицидам растений путем сверхэкспрессии генов протокса растений

Последовательности, кодирующие Protox-1 Arabidopsis как дикого типа, так и из устойчивых мутантных генов AraC-1Val, вырезают путем частичного разложения с помощью EcoRI и XhoI и клонируют в плазмиде экспрессии растения rCGN1761ENX. Полигенные экспрессирующие кластеры, содержащие гибриды 2X35S-reH Protox, вырезают путем разложения с помощью XbaI и клонируют в бинарном векторе pCIB200. Эти бинарные плазмиды с протоксом трансформируют путем электропорации в Agrobacterium и затем в Arabidopsis, используя метод вакуумной инфильтрации (Bechtold и др., 1993). Трансформантов селективируют канамицином и получают семенной материал T2 из многочисленных независимых линий. Этот семенной материал помещают в среду GM, содержащую различные концентрации ингабирующего протоке гербицида, и оценивают прорастание и выживание. Полигенные трансгенные линии, обладающие способностью к сверхэкспрессии либо дикого типа, либо устойчивого мутанта протокса дают значительное количество зеленых проростков на концентрации гербицида, которая является летальной для пустого контрольного вектора.

Различные представленные в настоящем описании модификации изобретения должны быть очевидны для специалистов в данной области техники. Подразумевается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

##### (1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

###### (I) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(A) НАИМЕНОВАНИЕ: CIBA-GEIGY AG

(B) УЛИЦА: Klybeckstr. 141

(C) ГОРОД: Базель

(E) СТРАНА: Швейцария

(F) ПОЧТОВЫЙ КОД (ZIP): 4002

(G) ТЕЛЕФОН: +41 61 69 11 11

(H) ТЕЛЕФАКС: +41 61 696 79 76

(I) ТЕЛЕКС: 962 991

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Манипулирование ферментативной активностью протопорфириноген-оксидазы у эукариот

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 20

(iv) ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА:

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ: флоппи-диск

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM PC, совместимый

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0, версия #1.25 (EPO)

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 1719 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(ix) ПРИЗНАК:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS

(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 31...1644

(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /note="кДНК Protox-1 Arabidopsis; последовательность из pWDC-2"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 1:

U A 7 1 5 3 6 C 2

U A 7 1 5 3 6 C 2

	<p>TGACAAAATT CCGAATTC TC TGGATTTC ATG GAG TTA TCT CTT CTC CGT CCG Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro 1 5</p>	54
5	<p>ACG ACT CAA TOG CTT CTT CCG TOG TTT TCG AAG CCC AAT CTC CGA TTA Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu 10 15 20</p>	102
	<p>AAT GTT TAT AAG CCT CTT AGA CTC CGT TGT TCA GTG GCC GGT GGA CCA Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro 25 30 35 40</p>	150
	<p>ACC GTC GGA TCT TCA AAA ATC GAA GGC GGA GGC ACC ACC ATC ACG Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr 45 50 55</p>	198
10	<p>ACG GAT TGT GTG ATT GTC GGC GGA GGT ATT AGT GGT CTT TGC ATC GCT Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala 60 65 70</p>	246
	<p>CAG GCG CTT GCT ACT AAG CAT CCT GAT GCT GCT CCG AAT TTA ATT GTG Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val 75 80 85</p>	294
15	<p>ACC GAG GCT AAG GAT CGT GTT GGA GGC AAC ATT ATC ACT CST GAA GAG Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu 90 95 100</p>	342
	<p>AAT GGT TTT CTC TCG GAA GAA GGT CCC AAT AGT TTT CAA CCG TCT GAT Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp 105 110 115 120</p>	390
20	<p>CCT ATG CTC ACT ATG GTG GTA GAT AGT GGT TIG AAG GAT GAT TTG GTG Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val 125 130 135</p>	438
	<p>TTG GGA GAT CCT ACT CCG CCA AGG TTT GTG TIG TGS AAT GGG AAA TTG Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu 140 145 150</p>	486
25	<p>AGG CCG GTT CCA TOG AAG CTA ACA GAC TTA CCG TTC TTT GAT TTG ATG Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met 155 160 165</p>	534
	<p>AGT ATT GGT GCG AAG ATT AGA GCT GGT TTT GGT GCA CTT GGC ATT CGA Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg 170 175 180</p>	582
	<p>CCG TCA CCT CCA GGT CGT GAA GAA TCT GTG GAG GAG TTT GTA CCG CGT Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg 185 190 195 200</p>	630
30	<p>AAC CTC GGT GAT GAG GTT TTT GAG CCG CTG ATG GAA CCG TTT TGT TCA Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser 205 210 215</p>	678
	<p>GGT GAT TAT GCT GGT GAT CCT TCA AAA CTG AGC ATG AAA GCA GCG TTT Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe 220 225 230</p>	726
35	<p>CCG AAG GAT TGG AAA CTA GAG CAA AAT GGT GGA AGC ATA ATA GGT GGT Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly 235 240 245</p>	774
	<p>ACT TTT AAG GCA ATT CAG GAG AGG AAA AAC GCT CCC AAG GCA GAA CGA Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg 250 255 260</p>	822
40	<p>GAC CCG GGC CTG CCA AAA CCA CAG GGC CAA ACA GTT GGT TCT TTC AGG Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg 265 270 275 280</p>	870
	<p>AAG GGA CTT CGA ATG TTG CCA GAA GCA ATA TCT GCA AGA TTA GGT AGC Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser 285 290 295</p>	918
	<p>AAA GAT AAG TTG TCT TGG AAG CTC TCA GGT ATC ACT AAG CTG GAG AGC Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser 300 305 310</p>	966
45	<p>GGA GGA TAC AAC TTA ACA TAT GAG ACT CCA GAT GGT TTA GAT TCC GTG Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val 315 320 325</p>	1014
	<p>CAG AGC AAA AGT GGT GTA ATG ACG GTG CCA TCT CAT GGT GCA AGT GGT Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly 330 335 340</p>	1062
50	<p>CTC TTG CCG CCT CTT TCT GAA TCT GCT GCA AAT GCA CTC TCA AAA CTA Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu 345 350 355 360</p>	1110
	<p>TAT TAC CCA CCA GPT GCA GCA GTA TCT ATC TCG TAC CCG AAA GAA GCA Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala 365 370 375</p>	1158
55	<p>ATC CGA ACA GAA TGT TTG ATA GAT GGT GAA CTA AAG GGT TTT GGG CAA Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln 380 385 390</p>	1206
	<p>TTG CAT CCA CCG ACG CAA GGA GTT GAA ACA TTA GSA ACT ATC TAC AGC Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser 395 400 405</p>	1254
60		
65		

TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGC GCA CCG CCC GGA AGA ATT TTG CTG TTG 1302  
 Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu  
 410 415 420

AAC TAC ATT GGC GGG TCT ACA AAC ACC GGA ATT CTG TCC AAG TCT GAA 1350  
 Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu  
 425 430 435 440

GGT GAG TTA GTG GAA GCA GTT GAC AGA GAT TTG AGG AAA ATG CTA ATT 1398  
 Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile  
 445 450 455

AAG CCT AAT TCG ACC GAT CCA CTT AAA TTA GGA GTT AGG GTA TGG OCT 1446  
 Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro  
 460 465 470

CMA GCC ATT CCT CAG TTT CTA GTT GGT CAC TTT GAT ATC CTT GAC ACG 1494  
 Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr  
 475 480 485

GCT AAA TCA TCT CTA ACG TCT TCG GGC TAC GAA GGG CTA TTT TTG GGT 1542  
 Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly  
 490 495 500

GCC AAT TAC GTC GCT GGT GTA GCC TTA GGC CGG TGT GTA GAA GGC GCA 1590  
 Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala  
 505 510 515 520

TAT GAA ACC GCS ATT GAG GTC AAC AAC TTC ATG TCA CGG TAC GCT TAC 1638  
 Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr  
 525 530 535

AAG TAAATGTAAA ACATTAAATC TCCAGCTTG CCTGATTTT ATTAAATATT 1691  
 Lys

TTGAGATATC CAAAAAAAAA AAAAAAAA 1719

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 537 аминокислот

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: протеин

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser  
 1 5 10 15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu  
 20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu  
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly  
 50 55 60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly  
 85 90 95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly  
 100 105 110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp  
 115 120 125

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg  
 130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr  
 145 150 155 160

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala  
 165 170 175

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu  
 180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu  
 195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser  
 210 215 220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln  
 225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg  
 245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln  
 260 265 270

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu  
 275 280 285

65

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu  
290 295 300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu  
305 310 315

5 Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr  
325 330 335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser  
340 345 350

10 Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val  
355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp  
370 375 380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val  
385 390 395 400

15 Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala  
405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn  
420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp  
435 440 445

20 Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu  
450 455 460

Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val  
465 470 475 480

25 Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser  
485 490 495

Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala  
500 505 510

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

30 Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys  
530 535

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 1738 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(ix) ПРИЗНАК:

(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS

(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 70...1596

(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /note="кДНК Protox-2 Arabidopsis; последовательность из pWDC-1"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 3:

```

TTTTTACTTT ATTTCCTGCA CTCCTTTGGA CTGGTCAGAG ATTTTGACTC TGAATGTTG 60
CAGATAGCA ATC GCG TCT GGA GCA GTA GCA GAT CAT CAA ATT GAA GCG 108
Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala
1 5 10
GTT TCA GGA AAA AGA GTC GCA GTC GTA GGT GCA GGT GTA AGT GGA CTT 156
Val Ser Gly Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu
15 20 25
GCG GCG GCT TAC AAG TTG AAA TCG AGG GGT TTG AAT GTG ACT GTG TTT 204
Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe
30 35 40 45
GAA GCT GAT GGA AGA GTA GGT GGG AAG TTG AGA AGT GTT ATG CAA AAT 252
Glu Ala Asp Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn
50 55 60
GGT TTG ATT TGG GAT GAA GGA GCA AAC ACC ATG ACT GAG GCT GAG CCA 300
Gly Leu Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro
65 70 75
GAA GTT GGS AGT TTA CTT GAT GAT CTT GGG CTT CGT GAG AAA CAA CAA 348
Glu Val Gly Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln
80 85 90
TTT CCA ATT TCA CAG AAA AAG CGG TAT ATT GTG CGG AAT GGT GTA CCT 396
Phe Pro Ile Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro
95 100 105

```

65

	GTG ATG CTA CCT ACC AAT CCC ATA GAG CTG GTC ACA AGT AGT GTG CTC Val Met Leu Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu 110 115 120 125	444
5	TCT ACC CAA TCT AAG TTT CAA ATC TTG TTG GAA CCA TTT TTA TGG AAG Ser Thr Gln Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys 130 135 140	492
	AAA AAG TCC TCA AAA GTC TCA GAT GCA TCT GCT GAA GAA AGT GTA AGC Lys Lys Ser Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser 145 150 155	540
	GAG TTC TTT CAA CGC CAT TTT GGA CAA GAG GTT GTT GAC TAT CTC ATC Glu Phe Phe Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile 160 165 170	588
10	GAC CCT TTT GTT GGT GGA ACA AGT GCT GCG GAC CCT GAT TCC CTT TCA Asp Pro Phe Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser 175 180 185	636
	ATG AAG CAT TCT TTC CCA GAT CTC TGG AAT GTA GAG AAA AGT TTT GGC Met Lys His Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly 190 195 200 205	684
15	TCT ATT ATA GTC GGT GCA ATC AGA ACA AAG TTT GCT GCT AAA GGT GGT Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly 210 215 220	732
	AAA AGT AGA GAC ACA AAG AGT TCT CCT GGC ACA AAA AAG GGT TCG CGT Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg 225 230 235	780
20	GGG TCA TTC TCT TTT AAG GGG GGA ATG CAG ATT CTT CCT GAT ACG TTG Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu 240 245 250	828
	TGC AAA AGT CTC TCA CAT GAT GAG ATC AAT TTA GAC TCC AAG GTA CTC Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu 255 260 265	876
25	TCT TTG TCT TAC AAT TCT GGA TCA ASA CAG GAG AAC TGG TCA TTA TCT Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser 270 275 280 285	924
	TGT GTT TCG CAT AAT GAA ACG CAG ASA CAA AAC CCC CAT TAT GAT GCT Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala 290 295 300	972
	GTA ATT ATG ACG GCT CCT CTG TGC AAT GTG AAG GAG ATG AAG GTT ATG Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met 305 310 315	1020
30	AAA GGA GGA CAA CCC TTT CAG CTA AAC TTT CTC CCC GAG ATT AAT TAC Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr 320 325 330	1068
	ATG CCC CTC TCG GAT TTA ATC ACC ACA TTC ACA AAG GAG AAA GTA AAG Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys 335 340 345	1116
35	AGA CCT CTT GAA GGC TTT GGG GTA CTC ATT CCA TCT AAG GAG CAA AAG Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys 350 355 360 365	1164
	CAT GGT TTC AAA ACT CTA GGT ACA CTT TTT TCA TCA ATG ATG TTT CCA His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro 370 375 380	1212
40	GAT CGT TCC CCT AGT GAC GTT CAT CTA TAT ACA ACT TTT AIT GGT GGG Asp Arg Ser Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly 385 390 395	1260
	AGT AGG AAC CAG GAA CTA GCC AAA GCT TCC ACT GAC GAA TTA AAA CAA Ser Arg Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln 400 405 410	1308
	GTT GTG ACT TCT GAC CTT CAG CGA CTG TRG GGG GTT GAA GGT GAA CCC Val Val Thr Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro 415 420 425	1356
45	GTG TCT GTC AAC CAT TAC TPT TGG AGG AAA GCA TTC CCG TTG TAT GAC Val Ser Val Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp 430 435 440 445	1404
	AGC AGC TAT GAC TCA GTC ATG GAA GCA ATT GAC AAG ATG GAG AAT GAT Ser Ser Tyr Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp 450 455 460	1452
50	CTA CCT GGG TTC TTC TPT GCA GGT AAT CAT CGA GGG GGG CTC TCT GTT Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val 465 470 475	1500
	GGG AAA TCA ATA GCA TCA GGT TGC AAA GCA GCT GAC CTT GTG ATC TCA Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser 480 485 490	1548
55	TAC CTG GAG TCT TGC TCA AAT GAC AAG AAA CCA AAT GAC AGC TTA TAACTGTGTC 1603 Tyr Leu Glu Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu 495 500 505	1663
	AGGTTTGTGTC OCTTTTATTATC ACTTACTTGTG TAACTTGTGA AAATGCRACA AGCCDCCGGT CGATTAGCCA ACAACTCAGC AAAACCCGGA TTCTCATAAG GCTCACTAAT TCCAGATYAA 1723	1723
	ACTAATTATG TAAAA 1738	1738

- 60 (2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 4:
- (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
- (А) ДЛИНА: 508 аминокислот
- (В) ТИП: аминокислота
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: протеин
- 65 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala Val Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala  
 20 25 30  
 5 Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Asp  
 35 40 45  
 Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn Gly Leu Ile  
 50 55 60  
 10 Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile  
 85 90 95  
 Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro Val Met Leu  
 100 105 110  
 15 Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln  
 115 120 125  
 Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser  
 130 135 140  
 Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe  
 145 150 155 160  
 20 Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe  
 165 170 175  
 Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His  
 180 185 190  
 Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly Ser Ile Ile  
 25 195 200 205  
 Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg  
 210 215 220  
 Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe  
 225 230 235 240  
 30 Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser  
 245 250 255  
 Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser  
 260 265 270  
 Tyr Asn Ser Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser  
 275 280 285  
 35 His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala Val Ile Met  
 290 295 300  
 Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met Lys Gly Gly  
 305 310 315 320  
 40 Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr Met Pro Leu  
 325 330 335  
 Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys Arg Pro Leu  
 340 345 350  
 Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys His Gly Phe  
 355 360 365  
 45 Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ser  
 370 375 380  
 Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly Ser Arg Asn  
 385 390 395 400  
 Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Val Val Thr  
 405 410 415  
 50 Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro Val Ser Val  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp Ser Ser Tyr  
 435 440 445  
 Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp Leu Pro Gly  
 450 455 460  
 55 Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser  
 465 470 475 480  
 Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Glu  
 485 490 495  
 60 Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu  
 500 505

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 5:  
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
 (А) ДЛИНА: 1698 пар оснований  
 (В) ТИП: нуклеиновая кислота  
 (С) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(ix) ПРИЗНАК:  
(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS  
(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 2...1453

(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /note="кДНК Protox-1 кукурузы (неполноразмерная); последовательность из рWDC-4"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 5:

G AAT TGG GGG GAC TGC TTC GTG GTC GGC GGA GGC ATC AGT GGC CTC	46
Asn Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu	
1 5 10 15	
TGC ACC GGG CAG GGG CTG GCC ACG CGG CAC GGC GTC GGG GAC GTG CTT	94
Cys Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu	
20 25 30	
GTC ACG GAG GGC CGC GCC CGC CCC GGC AAC ATT ACC ACC GTC GAG	142
Val Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu	
35 40 45	
CGC CCC GAG GAA GGG TAC CTC TGG GAG GAG GGT CCC AAC AGC TTC CAG	190
Arg Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln	
50 55 60	
CCC TCC GAC CCC GTT CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGA CTG AAG GAT	238
Pro Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp	
65 70 75	
GAC TTG GTT TTT GGG GAC CCA AAC GCG CCG CGT TTC GTG CTG TGG GAG	286
Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu	
80 85 90 95	
GGG AAG CTG AGG CCC GTG CCA TCC AAG CCC GCC GAC CTC CCG TTC TTC	334
Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe	
100 105 110	
GAT CTC ATG AGC ATC CCA GGG AAG CTC AGG GCC GGT CTA GGC GGG CTT	382
Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu	
115 120 125	
GGC ATC CGC CCG CCT CCT CCA GGC CGC GAA GAG TCA GTG GAG GAG TTC	430
Gly Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe	
130 135 140	
GTG CGC CGC AAC CTC GGT GCT GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATT GAG CCT	478
Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro	
145 150 155	
TTC TGC TCA GGT GTC TAT GCT GGT GAT CCT TCT AAG CTC AGC ATG AAG	526
Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys	
160 165 170 175	
GCT GCA TTT GGG AAG GTT TGG CCG TTG GAA GAA ACT GGA GGT AGT ATT	574
Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Thr Gly Gly Ser Ile	
180 185 190	
ATT GGT GGA ACC ATC AAG ACA ATT CAG GAG AGG AGC AAG AAT CCA AAA	622
Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys	
195 200 205	
CCA CCG AGG GAT GCC CGC CTT CCG AAG CCA AAA GGG CAG ACA GTT GCA	670
Pro Pro Arg Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala	
210 215 220	
TCT TTC AGG AAG GGT CTT GCC ATG CTT CCA AAT GCC AAT ACA TCC AGC	718
Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser	
225 230 235	
TTG GGT AGT AAA GTC AAA CTA TCA TGG AAA CTC ACG AGC ACT ACA AAA	766
Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys	
240 245 250 255	
TCA GAT GAC AAG GGA TAT GTT TTG GAG TAT GAA ACG CCA GAA GGG GTT	814
Ser Asp Asp Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val	
260 265 270	
GTT TCG GTG CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACT ATT CCA TCA TAT GTT	862
Val Ser Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val	
275 280 285	

У А 7 1 5 3 6 С 2

У А 7 1 5 3 6 С 2

	GCT AGC AAC ATT TTG CGT CCA CTT TCA AGC GAT GCT GCA GAT GCT CTA Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu 290 295 300	910
5	TCA AGA TTC TAT TAT CCA CCG GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCG TAT CCA Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro 305 310 315	958
	AAG GAA GCA NTT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAA CTC CAG GGC Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly 320 325 330 335	1006
	TTT GGC CAG TTG CAT CCA CCG NST CAA GGA GGT GAG ACA TTA GGA ACA Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr 340 345 350	1054
10	ATA TAC AGT TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGT GCT CCT GAC GGT AGS GTG Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val 355 360 365	1102
	TTA CTT CTA AAC TAC ATA GGA GGT GCT ACA AAC ACA GGA ATT GTT TCC Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser 370 375 380	1150
15	AAG ACT GAA AGT GAG CTG GTC GAA GCA GTT GAC CGT GAC CTC CGA AAA Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys 385 390 395	1198
	ATG CTT ATA AAT TCT ACA GCA CTG GAC CCT TTA GTC CTT GGT GTT CGA Met Leu Ile Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg 400 405 410 415	1246
20	GTG TGG CCA CAA GCC ATA CCT CAG TTC CTG GEA GGA CNT CTT GAT CTT Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu 420 425 430 435	1294
	CTG GAA GCC GCA AAA GCT GCC CTG GAC CGA GGT GGC TAC GAT GGG CTG Leu Glu Ala Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu 435 440 445	1342
	TTC CTA GGA GGG AAC TAT GTT GCA GGA GTT GCC CTG GGC AGA TGC GTT Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val 450 455 460	1390
25	GAG GGC GCG TAT GAA AGT GCC TGG CAA ATA TCT GAC TTC TTG ACC AAG Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys 465 470 475	1438
	TAT GCC TAC AAG TGATGAAGA AGTGGAGGCG TACTTGTTAA TCGTTPMGT Tyr Ala Tyr Lys 480	1490
30	TCGATAGATG AGGTGCTCC GGGGAAAAA AAGCTGAAAT AGTATTITTT ATTCATTAT TCGAAATGCG ATTTCCTGTC TTTTTCCTAT CAGTAAATG TTAATATTTA GTTCGTAGG AGATTGTTCT GTTCAGTCC CTCGAAAGA AATTTTATTT TTCATCTCTT TATGAGAGCT GTCTACTTA AAAAAAAAA AAAAAAA	1550 1610 1670 1698
35	(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 6: (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: (A) ДЛИНА: 483 аминокислоты (B) ТИП: аминокислота (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная	
40	(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: протеин (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 6:	
	Asn Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys 1 5 10 15	
	Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val 20 25 30	
45	Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg 35 40 45	
	Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro 50 55 60	
50	Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp 65 70 75 80	
	Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly 85 90 95	
	Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp 100 105 110	
55	Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly 115 120 125	
	Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val 130 135 140	
	Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe 145 150 155 160	
60	Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala 165 170 175	
65		

Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile  
180 185 190

5 Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro  
195 200 205

Pro Arg Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser  
210 215 220

Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu  
225 230 235 240

10 Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser  
245 250 255

Asp Asp Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val  
260 265 270

Ser Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala  
275 280 285

15 Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser  
290 295 300

Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys  
305 310 315 320

20 Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe  
325 330 335

Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile  
340 345 350

Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu  
355 360 365

25 Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys  
370 375 380

Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met  
385 390 395 400

Leu Ile Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val  
405 410 415

30 Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu  
420 425 430

Glu Ala Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe  
435 440 445

Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu  
450 455 460

35 Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr  
465 470 475 480

Ala Tyr Lys

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- 40 (A) ДЛИНА: 2061 пара оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 45 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(ix) ПРИЗНАК:

- 50 (A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS  
(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 64...1698

(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /note="кДНК Protox-2 кукурузы; последовательность из pWDC-3"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 7:

СТССТСТАСС ТССАСТССА ССАААААААА ССАААТССА ТССАСТССА ААСССТААСТ 60

САА АТГ СТС ГСТ ТТГ АСТ GCC TCA GCC TCA TCC GCT TCG TCC CAT CCT 108  
Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro  
1 5 10 15

55 ТАТ ССГ САС GCC TCC GCG САС АСТ СГТ ССГ ССС ССГ СТА СГТ GCG GTC 156  
Tyr Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val  
20 25 30

СТС GCG АТГ GGG GGC TCC САС САС ССС СГТ ССА GCG ССС GCC АГА ТCG 204  
Leu Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser  
35 40 45

60 СТС GCC СТС СТС GCC GCC GGC GTC АСГ ССГ СТС ССГ GCG GCG TAC АСГ 252  
Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg  
50 55 60

65

	CTC AGA CAG AGC GGC GTG AAC GTA ACG GTG TTC GAA GCG GCC GAC AGG Leu Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg 65 70 75	300
5	GCG GGA GGA AAG ATA CGG ACC AAT TCC GAG GCG GGG TTT GTC TGG GAT Ala Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp 80 85 90 95	348
	GAA GGA GCT AAC ACC ATG ACA GAA GGT GAA TGG GAG GCC AGT AGA CTG Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu 100 105 110	396
10	ATT GAT GAT CTT GGT CTA CAA GAC AAA CAG CAG TAT OCT AAC TOC CAA Ile Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln 115 120 125	444
	CAC AAG CGT TAC ATT GTC AAA GAT GGA GCA CCA GCA CTG ATT CCT TOG His Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser 130 135 140	492
	GAT CCC ATT TCG CTA ATG AAA AGC AGT GGT CTT TCG ACA AAA TCA AAG Asp Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys 145 150 155	540
15	ATT GCG TTA TTT TTT GAA CCA TTT CTC TAC AAG AAA GCT AAC ACA AGA Ile Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg 160 165 170 175	588
	AAC TCT GGA AAA GTG TCT GAG GAG CAC TIG AGT GAG AGT GTT GGG AGC Asn Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser 180 185 190	636
20	TTC TGT GAA CGC CAC TTT GGA AGA GAA GTT GTT GAC TAT TTT GTT GAT Phe Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp 195 200 205	684
	CCA TTT GTA GCT GGA ACA AGT GCA GGA GAT CCA GAG TCA CTA TCT ATT Pro Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile 210 215 220	732
25	CGT CAT GCA TTC CCA GCA TTG TGG AAT TTG CAA AGA AAG TAT GGT TCA Arg His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser 225 230 235	780
	GTT ATT GGT GGT GGC ATC TTG TCT AAG CTA GCA GCT AAA GGT GAT CCA Val Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro 240 245 250 255	828
30	GTA AAG ACA AGA CAT GAT TCA TCA GGG AAA AGA AGG AAT ACA CGA GTG Val Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val 260 265 270	876
	TCG TTT TCA TTT CAT GGT GGA ATG CAG TCA CTA ATA AAT GCA CTT CAC Ser Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His 275 280 285	924
	AAT GAA GTT GGA GAT GAT AAT GTG AAG CTT GGT ACA GAA GTG TTG TCA Asn Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser 290 295 300	972
35	TTG GCA TGT ACA TTT GAT GGA GTT CCT GCA CTA GGC AGG TGG TCA ATT Leu Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile 305 310 315	1020
	TCT GTT GAT TCG AAG GAT AGC GGT GAC AAG GAC CTT GCT AGT AAC CAA Ser Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln 320 325 330 335	1068
40	ACC TTT GAT GCT GGT ATA ATG ACA GCT CCA TTG TCA AAT GTC GCG AGG Thr Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg 340 345 350	1116
	ATG AAG TTC ACC AAA GGT GGA GCT CCG GTT GTT CTT GAC TTT CTT CCT Met Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro 355 360 365	1164
45	AAG ATG GAT TAT CTA CCA CTA TCT CTC ATG GTG ACT GCT TTT AAG AAG Lys Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys 370 375 380	1212
	GAT GAT GTC AAG AAA CCT CTG GAA GGA TTT GGG GTC TTA ATA CCT TAC Asp Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr 385 390 395	1260
	AAG GAA CAG CAA AAA CAT GGT CTG AAA ACC CTT GGG ACT CTC TTT TCC Lys Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser 400 405 410 415	1308
50	TCA ATG ATG TTC CCA GAT CGA GCT CCT GAT GAC CAA TAT TTA TAT ACA Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr 420 425 430	1356
	ACA TTT GTT GGG GGT AGC CAC AAT AGA GAT CTT GCT GGA GCT CCA ACG Thr Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr 435 440 445	1404
55	TCT ATT CTG AAA CAA CTT GTG ACC TCT GAC CTT AAA AAA CTC TTG GGC Ser Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly 450 455 460	1452
	GTA GAG GGG CAA CCA ACT TTT GTC AAG CAT GTA TAC TGG GGA AAT GCT Val Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala 465 470 475	1500
60		
65		

TTT CCT TTG TAT GGC CAT GAT TAT AGT TCT GTA TTG GAA GCT ATA GAA 1548  
Phe Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu  
480 485 490 495

AAG ATG GAG AAA APC CTT CCA GGG TTC TTC TAC GCA GGA AAT AGC AAG 1596  
Lys Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys  
500 505 510

GAT GGG CTT CCT GTT GGA AGT GTT ATA GCT TCA GGA AGC AAG GCT GCT 1644  
Asp Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala  
515 520 525

GAC CTT GCA ATC TCA TAT CTT GAA TCT CAC ACC AAG CAT AAT AAT TCA 1692  
Asp Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser  
530 535 540

10 CAT TGAAGTGTG TGACCTATCC TCTAGCAGTT GTGACAAAT TTCCTCAGTT 1745  
His  
545

CATGTACAGT AGAARCCGAT GCGTTCAGT TTCAGAACAT CTCACCTTCT TCAGATATTA 1805

ACCTTCSTTT GAACATCCAC CAGAAAGTA GTCACATGTG TANGTGGAA AATGAGTTTA 1865

15 AAACATATA TGGCGCCGA AATGTTCCTT TTGTGTTTCC TCACAAGTGG OCTAGACAC 1925

TTGATGTGG AATATCATTT AATTTGTG AATTTGTTGA GAACACATGC GTGACGTGTA 1985

ATATTTGCTT AATTTGATTT TAGCAGTAGT CTGTGGCAGA TTATGCTTTA CCCCCTTAAA 2045

AAAAAAAA AAAAAA 2061

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 544 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: протеин

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 8:

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro Tyr  
1 5 10 15

Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu  
20 25 30

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val  
35 40 45

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu  
50 55 60

Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala  
65 70 75 80

35 Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Leu  
85 90 95

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile  
100 105 110

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His  
115 120 125

40 Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp  
130 135 140

Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile  
145 150 155 160

Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn  
165 170 175

Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe  
180 185 190

Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro  
195 200 205

50 Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg  
210 215 220

His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val  
225 230 235 240

Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val  
245 250 255

55 Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser  
260 265 270

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn  
275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu  
290 295 300

60 Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser  
305 310 315 320

65

5 Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr  
325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met  
340 345 350

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys  
355 360 365

Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp  
370 375 380

10 Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys  
385 390 395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser  
405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr  
420 425 430

15 Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser  
435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val  
450 455 460

20 Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe  
465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys  
485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp  
500 505 510

25 Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp  
515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His  
530 535 540

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- 30 (A) ДЛИНА: 1697 пар оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 35 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(ix) ПРИЗНАК:  
(A) ИМЯ/КЛЮЧ: CDS  
(B) ПОЛОЖЕНИЕ: 29...1501
- 40 (D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /note="кДНК Protox-3 дрожжей; последовательность из pWDC-5"  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 9:

```

TTGGCAATTG CCGTGAACCA ACAATTCT ATG TCA ATT GCA ATT TGT GGA GGA      52
                Met Ser Ile Ala Ile Cys Gly Gly
                1                5

GGT ATA GCT GGT CTT AGT ACA GCA TTT TAT CTT GCT AGA TIG ATT CCA      100
Gly Ile Ala Gly Leu Ser Thr Ala Phe Tyr Leu Ala Arg Leu Ile Pro
10                15                20

AAA TGT ACT ATT GAT TTG TAC GAA AAA GGT CCT CGT TTA GGT GGA TGG      148
Lys Cys Thr Ile Asp Leu Tyr Glu Lys Gly Pro Arg Leu Gly Gly Trp
25                30                35                40

CTT CAG TCG GTC AAA ATC CCG TGT GCA GAT TCT CCA ACA GGA ACG GTT      196
Leu Gln Ser Val Lys Ile Pro Cys Ala Asp Ser Pro Thr Gly Thr Val
45                50                55

TIG TTT GAG CAA GGT CCT AGA ACT CTT CGT CCT GCT GGG GTT GCT GGC      244
Leu Phe Glu Gln Gly Pro Arg Thr Leu Arg Pro Ala Gly Val Ala Gly
60                65                70

TTA GCA AAC TTA GAT TTA ATT AGC AAG TTG GGC ATC GAA GAC AAG TIG      292
Leu Ala Asn Leu Asp Leu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Glu Asp Lys Leu
75                80                85

TTA AGG ATT TGG AGC AAT TCT CCC AGC GCA AAA AAC CGA TAT ATT TAT      340
Leu Arg Ile Ser Ser Asn Ser Pro Ser Ala Lys Asn Arg Tyr Ile Tyr
90                95                100

TAC CCA GAT CGC TTA AAT GAA ATT CCT TCA AGC ATT TTA GGG AGT ATA      388
Tyr Pro Asp Arg Leu Asn Glu Ile Pro Ser Ser Ile Leu Gly Ser Ile
105                110                115                120

AAG TCG ATT ATG CAG CCT GCT TTG CGT CCG ATG CCT TTG GCT ATG ATG      436
Lys Ser Ile Met Gln Pro Ala Leu Arg Pro Met Pro Leu Ala Met Met
125                130                135

```

65

	CTT GAG CCC TTT CGT AAA AGT AAG CGA GAT TCG ACA GAT GAA AGC GTG Leu Glu Pro Phe Arg Lys Ser Lys Arg Asp Ser Thr Asp Glu Ser Val 140 145 150	484
5	GGT TCA TTT ATG AGA AGA AGA TTT GGT AAA AAC GTT ACG GAT AGA GTT Gly Ser Phe Met Arg Arg Phe Gly Lys Asn Val Thr Asp Arg Val 155 160 165	532
	ATG AGT GCA ATG ATA AAT GGT ATT TAT GCT GGT GAT TTG AAT GAT TTG Met Ser Ala Met Ile Asn Gly Ile Tyr Ala Gly Asp Leu Asn Asp Leu 170 175 180	580
	TCT ATG CAT TCT AGC ATG TTT GGA TTT TTA GCG AAG ATT GAA AAA AAG Ser Met His Ser Ser Met Phe Gly Phe Leu Ala Lys Ile Glu Lys Lys 185 190 195 200	628
10	TAT GGA AAC ATT ACT TTG GGA TTA ATT AGA GCT CTT CTT GCA CGT GAA Tyr Gly Asn Ile Thr Leu Gly Leu Ile Arg Ala Leu Leu Ala Arg Glu 205 210 215	676
	ATA TTA TCT CCT GCT GAG AAA GCT TTG GAA AGC AGC ACT ACT CGC AGA Ile Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Leu Glu Ser Ser Thr Thr Arg Arg 220 225 230	724
15	GCC AAA AAC AGC AGA GCT GTC PAA CAG TAT GAA ATC GAC AAG TAT GTT Ala Lys Asn Ser Arg Ala Val Lys Gln Tyr Glu Ile Asp Lys Tyr Val 235 240 245	772
	GCT TTC AAG GAA GGG ATT GAG ACT ATT ACA TTG TCA ATA GCA GAT GAA Ala Phe Lys Glu Gly Ile Glu Thr Ile Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu 250 255 260	820
20	TTA AAA AAA ATG CCG AAT GTC AAG ATA CAT CTA AAC AAA CCG GCC CAA Leu Lys Lys Met Pro Asn Val Lys Ile His Leu Asn Lys Pro Ala Gln 265 270 275 280	868
	ACT TTG GTT CCA CAT AAA ACT CAG TCT CTT GTA GAC GTC AAT GGT CAA Thr Leu Val Pro His Lys Thr Gln Ser Leu Val Asp Val Asn Gly Gln 285 290 295	916
	GCT TAC GAG TAT GIT GAG TTT GCA AAC TCT TCT CGC AAT TTA GAG AAT Ala Tyr Glu Tyr Val Val Phe Ala Asn Ser Ser Arg Asn Leu Glu Asn 300 305 310	964
25	CTA ATA TCT TGT CCT AAA ATG GAA ACT CCG ACG TCG AGT GTT TAT GTC Leu Ile Ser Cys Pro Lys Met Glu Thr Pro Thr Ser Ser Val Tyr Val 315 320 325	1012
	GTC AAC GAT TAT TAT AAG GAC CCT AAT GIT CTT CCA ATC CGT GGT TTT Val Asn Val Tyr Tyr Lys Asp Pro Asn Val Leu Pro Ile Arg Gly Phe 330 335 340	1060
30	GGG CTT TTG ATT CCA TCA TGC ACT CCA AAT AAT CCG AAT CAT GAT CTT Gly Leu Leu Ile Pro Ser Cys Thr Pro Asn Asn Pro Asn His Val Leu 345 350 355 360	1108
	GGT ATC GAT TTT GAT AGT GAG CAA AAC AAC CCT GRA AAT GGA AGC AAG Gly Ile Val Phe Asp Ser Glu Gln Asn Asn Pro Glu Asn Gly Ser Lys 365 370 375	1156
35	GTC ACT GTC ATG ATG GGA GGG TCT GCT TAT ACA AAA AAT ACT TCT TTG Val Thr Val Met Met Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Lys Asn Thr Ser Leu 380 385 390	1204
	ATT CCA ACC AAC CCC GAA GAA GCC GAT AAC AAT GCT CTC AAA GCT TTG Ile Pro Thr Asn Pro Glu Glu Ala Val Asn Asn Ala Leu Lys Ala Leu 395 400 405	1252
40	CAG CAT ACT TTA AAA ATA TCC AGT AAG CCA ACA CTC ACG AAT GCA ACA Gln His Thr Leu Lys Ile Ser Ser Lys Pro Thr Leu Thr Asn Ala Thr 410 415 420	1300
	TTA CAA CCA AAT TGC ATC CCT CAA TAT GGT GTT GGG CAT CAA GAT AAT Leu Gln Pro Asn Cys Ile Pro Gln Tyr Arg Val Gly His Gln Asp Asn 425 430 435 440	1348
	CTT AAT TCT TTG AAA TCT TGG ATT GAG AAA AAT ATG GGA GGG CGA AAT Leu Asn Ser Leu Lys Ser Trp Ile Glu Lys Asn Met Gly Gly Arg Ile 445 450 455	1396
45	CTT CTA ACT GGA AGT TGG TAT AAT GGT GTT AGT AAT GGG GAT TGT AAT Leu Leu Thr Gly Ser Trp Tyr Asn Gly Val Ser Ile Gly Asp Cys Ile 460 465 470	1444
	ATG AAT GGA CAT TCA ACA GCT CGA AAA CTA GCA TCA TTG ATG AAT TCT Met Asn Gly His Ser Thr Ala Arg Lys Leu Ala Ser Leu Met Asn Ser 475 480 485	1492
50	TCT TCT TGAGCGTTA TAAATGTGA TATAAAATTA GIATATAGTT CCITTGATTA Ser Ser 490	1548
	TTTTATGAGT TGAAATGCC ACITGTGAA TAAITTTGCA CAAGCCCTTT TATTACAGAC 1608	
	GIATATGCGA GGACATCGA CAACGTTTG AAATTAATAA TCATATGCGT TTTAGCTTAA 1668	
	GACATCAAGG TCATCAATTA TAAATTTT 1697	

55 (2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 10:  
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
 (А) ДЛИНА: 490 аминокислот  
 (В) ТИП: аминокислота  
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная  
 60 (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: протеин  
 (xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 10:

65

Met Ser Ile Ala Ile Cys Gly Gly Gly Ile Ala Gly Leu Ser Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Tyr Leu Ala Arg Leu Ile Pro Lys Cys Thr Ile Asp Leu Tyr Glu  
 20 25 30  
 5 Lys Gly Pro Arg Leu Gly Gly Trp Leu Gln Ser Val Lys Ile Pro Cys  
 35 40 45  
 Ala Asp Ser Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Glu Gln Gly Pro Arg Thr  
 50 55 60  
 10 Leu Arg Pro Ala Gly Val Ala Gly Leu Ala Asn Leu Asp Leu Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Gly Ile Glu Asp Lys Leu Leu Arg Ile Ser Ser Asn Ser Pro  
 85 90 95  
 Ser Ala Lys Asn Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Arg Leu Asn Glu Ile  
 100 105 110  
 15 Pro Ser Ser Ile Leu Gly Ser Ile Lys Ser Ile Met Gln Pro Ala Leu  
 115 120 125  
 Arg Pro Met Pro Leu Ala Met Met Leu Glu Pro Phe Arg Lys Ser Lys  
 130 135 140  
 Arg Asp Ser Thr Asp Glu Ser Val Gly Ser Phe Met Arg Arg Arg Phe  
 145 150 155 160  
 20 Gly Lys Asn Val Thr Asp Arg Val Met Ser Ala Met Ile Asn Gly Ile  
 165 170 175  
 Tyr Ala Gly Asp Leu Asn Asp Leu Ser Met His Ser Ser Met Phe Gly  
 180 185 190  
 25 Phe Leu Ala Lys Ile Glu Lys Lys Tyr Gly Asn Ile Thr Leu Gly Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Ala Leu Leu Ala Arg Glu Ile Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala  
 210 215 220  
 Leu Glu Ser Ser Thr Thr Arg Arg Ala Lys Asn Ser Arg Ala Val Lys  
 225 230 235 240  
 30 Gln Tyr Glu Ile Asp Lys Tyr Val Ala Phe Lys Glu Gly Ile Glu Thr  
 245 250 255  
 Ile Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Leu Lys Lys Met Pro Asn Val Lys  
 260 265 270  
 Ile His Leu Asn Lys Pro Ala Gln Thr Leu Val Pro His Lys Thr Gln  
 275 280 285  
 35 Ser Leu Val Asp Val Asn Gly Gln Ala Tyr Glu Tyr Val Val Phe Ala  
 290 295 300  
 Asn Ser Ser Arg Asn Leu Glu Asn Leu Ile Ser Cys Pro Lys Met Glu  
 305 310 315 320  
 40 Thr Pro Thr Ser Ser Val Tyr Val Val Asn Val Tyr Tyr Lys Asp Pro  
 325 330 335  
 Asn Val Leu Pro Ile Arg Gly Phe Gly Leu Leu Ile Pro Ser Cys Thr  
 340 345 350  
 Pro Asn Asn Pro Asn His Val Leu Gly Ile Val Phe Asp Ser Glu Gln  
 355 360 365  
 45 Asn Asn Pro Glu Asn Gly Ser Lys Val Thr Val Met Met Gly Gly Ser  
 370 375 380  
 Ala Tyr Thr Lys Asn Thr Ser Leu Ile Pro Thr Asn Pro Glu Glu Ala  
 385 390 395 400  
 Val Asn Asn Ala Leu Lys Ala Leu Gln His Thr Leu Lys Ile Ser Ser  
 405 410 415  
 50 Lys Pro Thr Leu Thr Asn Ala Thr Leu Gln Pro Asn Cys Ile Pro Gln  
 420 425 430  
 Tyr Arg Val Gly His Gln Asp Asn Leu Asn Ser Leu Lys Ser Trp Ile  
 435 440 445  
 Glu Lys Asn Met Gly Gly Arg Ile Leu Leu Thr Gly Ser Trp Tyr Asn  
 450 455 460  
 55 Gly Val Ser Ile Gly Asp Cys Ile Met Asn Gly His Ser Thr Ala Arg  
 465 470 475 480  
 Lys Leu Ala Ser Leu Met Asn Ser Ser Ser  
 485 490

60 (2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 11:  
 (i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
 (А) ДЛИНА: 41 пара оснований  
 (В) ТИП: нуклеиновая кислота  
 (С) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
 65 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: олигонуклеотид, применяемый для конструирования pCGN1761ENX  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 11:  
AATTATGACG TAACGTAGGA ATTAGCGGCC CGCTCTCGAG T
- 5  
10  
(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 12:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 40 пар оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- (ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: олигонуклеотид, применяемый для конструирования pCGN1761ENX  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:12:  
AATTAСТCGA GAGCGGCCGC GAATTCCTAC GTTACGTCAT
- 15  
20  
(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 13:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 31 пара оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 25  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0003, применяемый для конструирования pSOG10  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 13:  
СТCGGATССAGСAGATTCGAAGAAGGTACAG
- 30  
(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 14:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 31 пара оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 35  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0004, применяемый для конструирования pSOG10  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 14:  
ACGGGATССААСТТССТАGCTGAAAAATGGG
- 40  
(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 15:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 26 пар оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 45  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0031, применяемый для конструирования pSOG19  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 15:  
CATGAGGGACTGACCACCCGGGGATC
- 50  
55  
(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 16:  
(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:  
(A) ДЛИНА: 24 пары оснований  
(B) ТИП: нуклеиновая кислота  
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная  
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная
- 60  
(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота  
(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0010, применяемый для конструирования pSOG19  
(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет  
(iv) АНТИСМЫСЛ: нет  
(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 16:
- 65

AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 17:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 24 пары оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота

(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0016, применяемый для конструирования pSOG19

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 17:

GСТАССАТGGССАСАТАГААСС

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 18:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 23 пары оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота

(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0017, применяемый для конструирования pSOG19

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 18:

CGAGAGСТCGСАТТТСААССТТG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 19:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 28 пар оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота

(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0039, применяемый для конструирования pSOG30

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 19:

CGACATGGTACGTССТGTAGAAАСССАСА

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 20:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 24 пары оснований

(B) ТИП: нуклеиновая кислота

(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: другая нуклеиновая кислота

(A) ОПИСАНИЕ: праймер SON0041, применяемый для конструирования pSOG30

(iii) ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) АНТИСМЫСЛ: нет

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 20:

ATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC

### Формула винаходу

1. Выделенная молекула ДНК, которая кодирует протопорфириногенаксодазу, аминокислотная последовательность которой выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10.

2. Выделенная молекула ДНК, которая кодирует протопорфириногенаксодазу, аминокислотная последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 2, где:

а) аланин в положении 220 заменен на аминокислоту, выбранную из группы, включающей валин, треонин, лейцин и цистеин; и/или

б) глицин в положении 221 заменен на серин; и/или

в) тирозин в положении 426 заменен на аминокислоту, выбранную из группы, включающей цистеин, изолейцин, лейцин, валин и треонин.

3. Выделенная молекула ДНК по пункту 2, где аланин в положении 220 SEQ ID NO: 2 заменен на валин.

4. Выделенная молекула ДНК по пункту 2, где тирозин в положении 426 SEQ ID NO: 2 заменен на цистеин.

5. Выделенная молекула ДНК, которая кодирует протопорфириногенаксодазу, аминокислотная

последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 6, где:

- а) аланин в положении 166 SEQ ID NO: 6 заменен на валин; и/или
- б) глицин в положении 167 SEQ ID NO: 6 заменен на серин; и/или
- в) тирозин в положении 372 SEQ ID NO: 6 заменен на цистеин.

6. Экспрессионная кассета, которая содержит промотор, функционально связанный с выделенной молекулой ДНК по любому из пунктов 1-5.

7. Рекombинантный вектор, который содержит экспрессионную кассету по пункту 6.

8. Клетка-хозяин, стабильно трансформированная при помощи вектора по пункту 7, где указанная клетка-хозяин способна экспрессировать указанную молекулу ДНК.

9. Растительная клетка, трансформированная молекулой ДНК по любому из пунктов 1-5, где указанная молекула ДНК способна экспрессироваться в растительной клетке и придает растительной клетке устойчивость к гербициду в количествах, которые ингибируют встречающуюся в естественных условиях активность протокса.

10. Растение, которое содержит клетку по пункту 9.

11. Способ получения растения, устойчивого к гербицидам, которые ингибируют протопорфириногенаксидазу, который включает:

а) получение экспрессионной кассеты, содержащей промотор, который активный в растении, функционально связанный с последовательностью ДНК, которая кодирует протопорфириногенаксидазу, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10 или молекулами ДНК, которые являются гомологичными им и селективно гибридизуются данными молекулами ДНК;

б) трансформирование растительного материала экспрессионной кассетой; и

в) регенерацию растения из указанного растительного материала.

12. Способ борьбы с ростом нежелательной растительности, который включает обработку популяции растений по пункту 10 или полученных способом по пункту 11, и нежелательной растительности эффективным количеством гербицида, который ингибирует протопорфириногенаксидазу.

13. Применение последовательности ДНК, которая кодирует протопорфириногенаксидазу, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10 или молекул ДНК, которые являются гомологичными им и селективно гибридизуются данными молекулами ДНК, для получения растений, устойчивых к гербицидам, которые ингибируют протопорфириногенаксидазу.

Офіційний бюлетень "Промислоава власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2004, N 12, 15.12.2004. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.