



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 168 544**⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/53, 15/82, 9/06**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 92016544/13, 24.06.1991
(24) Дата начала действия патента: 24.06.1991
(30) Приоритет: 25.06.1990 US 07/543,236
(43) Дата публикации заявки: 27.10.1995
(46) Дата публикации: 10.06.2001
(56) Ссылки: TIBTECH, vol.8, № 3, 1990. TRENDIN
GENETICS, vol.4, № 8, 1988. APPLIED AND
ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol.54, №
12, 1988. ШМАЛЬЦ Х. Селекция растений (пер.
с нем.). - М.: Колос, 1973.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 24.12.1992
(86) Заявка РСТ:
US 91/04514 (24.06.1991)
(87) Публикация РСТ:
WO 92/00377 (09.01.1992)
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Большая Спасская 25,
стр.3, ООО "Городисский и Партнеры",
Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
МОНСАНТО КОМПАНИ (US)
(72) Изобретатель: Ганеш Мерти КИШОР (US),
Джерард Фрэнсис БЭРРИ (US)
(73) Патентообладатель:
МОНСАНТО КОМПАНИ (US)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **МОЛЕКУЛА ВЫДЕЛЕННОЙ ДВУНИТЕВОЙ ДНК, МОЛЕКУЛА РЕКОМБИНАНТНОЙ ДВУНИТЕВОЙ ДНК И
СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ**

(57)
Изобретение может быть использовано в
сельском хозяйстве. Трансформирование
растений с помощью генов, разрушающих
гербицид глифозат, позволяет получить

растения с устойчивостью к данному
гербициду, применяемому для борьбы с
сорняками и др. 3 с. и 6 з.п. ф-лы, 13 ил.,
17 табл.

RU
2
1
6
8
5
4
4
C
2

RU
2
1
6
8
5
4
4
C
2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 168 544** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/53, 15/82, 9/06**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 92016544/13, 24.06.1991
(24) Effective date for property rights: 24.06.1991
(30) Priority: 25.06.1990 US 07/543,236
(43) Application published: 27.10.1995
(46) Date of publication: 10.06.2001
(85) Commencement of national phase: 24.12.1992
(86) PCT application:
US 91/04514 (24.06.1991)
(87) PCT publication:
WO 92/00377 (09.01.1992)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja 25,
str.3, OOO "Gorodisskij i Partnery",
Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
MONSANTO KOMPANI (US)
(72) Inventor: Ganesh Merti KISHOR (US),
Dzherard Frehnsis BEHRRRI (US)
(73) Proprietor:
MONSANTO KOMPANI (US)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) MOLECULE OF ISOLATED DOUBLE-STRANDED DNA, MOLECULE OF RECOMBINANT
DOUBLE-STRANDED DNA AND METHOD OF GENETICALLY TRANSFORMED PLANTS PREPARING

(57) Abstract:
FIELD: molecular biology, genetic
engineering, agriculture. SUBSTANCE:
transformation of plants with genes
destructing herbicide glyphosate ensures to

obtain plants exhibiting resistance to this
herbicide used for control of weeds and
others. Invention can be used in
agriculture. EFFECT: improved method of
plants transformation. 9 cl, 13 dwg, 16 tbl, 6 ex

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

Данная заявка является частичным продолжением находящейся на рассмотрении заявки N 07/543236, поданной 25 июня 1990 г.

Последние достижения генной инженерии обеспечили специалистов необходимым инструментом трансформации растений с введением в них чужеродных генов. В настоящее время можно создавать растения с уникальными с точки зрения агрономии показателями. Несомненно, среди достигаемых при этом преимуществ: более экономически эффективная, экологически совместимая борьба с сорняками путем создания толерантности к гербицидам. Толерантные к гербицидам растения могут уменьшить необходимость в обработке почвы с эффективным снижением тем самым эрозии почвы.

Одним из гербицидов, подвергавшимся в этой связи тщательному изучению, является N-фосфонометилглицин, обычно называемый глифозатом. Глифозат ингибирует участие шикимовой кислоты в биосинтезе ароматических соединений, в том числе аминокислоты и витамины. Более конкретно, глифозат ингибирует превращение фосфоенолпировиноградной кислоты и 3-фосфошикимовой кислоты в 5-енолпирувил-3-фосфошикимовую кислоту путем ингибирования фермента 5-енолпирувил-3-фосфошикимовой кислоты-синтетазы (ЕПФШ-синтетаза или ЕПФШС).

Показано, что толерантные к глифозату растения могут быть созданы введением в геном растения способности продуцировать на высоком уровне ЕПФШ-синтетазу, при этом рекомендуется, чтобы фермент был толерантным по отношению к глифозату. (Shah и др., 1986). Введение в растения гена-(ов) разрушения глифозата могло бы послужить способом придания растениям толерантности к глифозату и/или повышения толерантности трансгенного растения, уже экспрессирующего толерантную к глифозату ЕПФШ-синтетазу, в зависимости от физиологического действия продуктов разрушения.

Метаболизм (разрушение) исследован на самых различных растениях, и в большинстве таких исследований установлена небольшая степень такого разрушения. В тех случаях, когда разрушение происходит, начальным продуктом разрушения является аминометилфосфонат (АМФК) (Coupland, 1985; Marshall и др., 1987). И в таких случаях неясно, метаболизируется ли глифозат растением или же посторонними бактериями на поверхности листьев, на которые наносят глифозат. Согласно сообщениям, АМФК для большинства видов растений менее фитотоксичен, чем глифозат (Franz, 1985), но не для всех видов растений (Maier, 1983; Tanaka и др., 1988). В почве разрушение глифозата происходит более интенсивно и быстро (Torstensson, 1985). Основным идентифицированным продуктом разрушения является АМФК (Rueppel и др., 1977; Nomuga и Hilton, 1977) - фосфонат, который может быть метаболизирован самыми различными микроорганизмами (Zeleznick и др., 1963; Masfalerz и др., 1965; Cook и др., 1978; Daughton и др., 1979a, 1979b; Wackett и др., 1987a). Идентифицирован целый ряд чистых

бактериальных культур, разрушающих глифозат по одному из двух известных путей (Moore и др., 1983; Talbot и др., 1984; Shinabarger и Braymer, 1986; Ballthazor и Hallas, 1986; Kishore и Jacob, 1987; Wackett и др., 1987a; Pipke и др., 1987a; Pipke и др., 1987; Hallas и др., 1988; Jacob и др., 1985 и 1988; Pipke и Amrhein, 1988; Quinn и др., 1988 и 1989; Lerbs и др., 1990; Schowanek и Verstraete, 1990; Weidhase и др., 1990; Liu и др., 1991). Путь с участием "С-Р-лиазы", разрушающей глифозат до саркозина и неорганического фосфата (Pi), указан для вида *Pseudomonas* (Shinabarger и Braymer, 1986; Kishore и Jacob, 1987) и вида *Arthrobacter* (Pipke и др., 1987b). Чистые культуры, способные разрушать глифозат до АМФК, указаны для вида *Flavobacterium* (Balthazor и Hallas, 1986), для вида *Pseudomonas* (Jacob и др., 1988) и для *Arthrobacter atrocyaneus* (Pipke и Amrhein, 1988). Кроме того, большое число изолятов, превращающих глифозат в АМФК, идентифицирован в промышленных активированных илах, которыми обрабатывают отходы производства глифозата (Hallas и др., 1988). Однако, число и природа бактериальных генов, ответственных за указанные разрушения, до настоящего времени не были определены, как не был выделен и ген-(ы).

Соответственно, в одном из его аспектов целью изобретения является создание новых генов, кодирующих фермент метаболизма глифозата, превращающий глифозат в аминометилфосфонат и глиоксилат.

Другой целью изобретения является повышение активности фермента метаболизма глифозата по отношению к глифозату путем замены специфичных аминокислотных остатков.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в создании генетически модифицированных растений, экспрессирующих ген, кодирующий фермент метаболизма глифозата и отличающийся повышенной толерантностью к гербицидному глифозату.

И еще одна цель изобретения заключается в том, чтобы показать, что фермент метаболизма может быть направлен с помощью хлоропластного пептида в пластиды и что направленный в пластиды фермент придает им толерантность к глифозату на высоком уровне.

И наконец, целью изобретения является создание метода отбора трансформированной растительной ткани использованием фермента метаболизма глифозата в качестве поддающегося отбору маркера в присутствии ингибирующих концентраций глифозата.

Эти и другие цели, аспекты и признаки настоящего изобретения для специалиста станут очевидными из нижеследующего описания и рабочих примеров.

Настоящим изобретением даются структуральные ДНК конструкторы, кодирующие фермент глифозат-оксидоредуктазу и применимые в создании способности разрушать глифозат в гетерологичных микроорганизмах (напр.: бактериях и растениях), а также в создании толерантных к глифозату растений.

В соответствии с вышеизложенным согласно с одним из аспектов настоящего

изобретения дается способ создания генетически трансформированных растений, толерантных по отношению к гербициду глифозату, включающий стадии:

(а) внедрения в геном клетки растения рекомбинантной двунитовой молекулы ДНК, состоящей из:

(I) промотора, действие которого в клетках растения вызывает продуцирование РНК последовательности,

(II) структуральной ДНК последовательности, вызывающей продуцирование РНК последовательности, кодирующей фермент глифозат-оксидоредуктазу,

(III) 3'-нетрансляционной ДНК последовательности, действие которой в клетках растения вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК последовательности;

причем промотор гетерологичен по отношению к кодирующей последовательности и способен вызывать достаточную экспрессию указанного фермента в растительных тканях, включая меристематическую ткань, с повышением устойчивости клетки растения, трансформированной указанным геном, к глифозату;

(b) получения трансформированной клетки растения и

(c) регенерирования из трансформированной клетки растения генетически трансформированного растения с повышенной толерантностью к гербициду глифозату.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения дается рекомбинантная двунитовая молекула ДНК, состоящая последовательно из:

(а) промотора, действие которого в клетках растения вызывает продуцирование РНК последовательности;

(b) структуральной ДНК последовательности, вызывающей продуцирование РНК последовательности, кодирующей фермент глифозат-оксидоредуктазу; и

(c) 3'-нетрансляционной области, действие которой в растении вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК последовательности.

Согласно еще одному аспекту изобретения даются бактериальные и трансформированные растительные клетки, содержащие, соответственно, ДНК, состоящую из вышеупомянутых элементов (а), (b) и (с).

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения даются дифференцированные растения, включающие трансформированные растительные клетки, охарактеризованные выше, и отличающиеся толерантностью к гербициду глифозату.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения дается способ избирательной борьбы с сорняками на полях с культурными растениями, на которых высажены семена или рассада культурных растений, способ включает стадии:

(а) высаживания семян культурных растений или самих растений, отличающихся толерантностью к глифозату в результате введения в семена или растения рекомбинантной двунитовой молекулы ДНК, состоящей из:

(I) последовательности промотора, действие которой в растениях вызывает продуцирование РНК последовательности,

(II) структуральной ДНК последовательности, вызывающей продуцирование РНК, кодирующей фермент глифозат-оксидоредуктазу,

(III) 3'-нетрансляционной области, кодирующей сигнал полиаденилирования, действие которого в растениях вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК последовательности. Причем промотор гетерологичен по отношению к кодирующей последовательности и способен вызывать достаточную экспрессию указанного фермента в растительной ткани, включая меристематическую ткань, с повышением толерантности клетки растения, трансформированной указанным геном; и

(b) нанесения на растения и семена на полях достаточного количества для борьбы с сорняками гербицида глифозата без существенного действия на урожай.

В особенно рекомендуемом воплощении изобретения двунитовая молекула ДНК включает ген для экспрессии в растении, представляющий собой структуральную ДНК, кодирующую слитый полипептид, содержащий аминоконцевой хлоропластный транзитный пептид, способный вызывать импортирование карбоксиконцевого фермента глифозат-оксидоредуктазу в хлоропласт клетки растения, экспрессирующей указанный ген.

Другое воплощение настоящего изобретения заключается в применении гена глифозат-оксидоредуктазы в качестве поддающегося отбору маркера для отбора и идентификации трансформированной растительной ткани.

На фиг. 1 приведена ДНК последовательность для полной длины промотора мозаичного вируса норичника (FMV).

На фиг. 2 приведена структуральная ДНК последовательность для гена глифозат-оксидоредуктазы из бактериального изолята LBAA.

На фиг. 3 приведено сравнение подвергнутого обработке структурального гена глифозат-оксидоредуктазы с модифицированным геном глифозат-оксидоредуктазы, предназначенным для повышенной экспрессии в растениях. Подвергнутый обработке ген глифозат-оксидоредуктазы показан в виде верхней ДНК последовательности. Единственные изменения, осуществленные в модифицированном гене, показаны в нижерасположенной нити последовательностей.

На фиг. 4 приведено сравнение подвергнутого обработке структурального гена глифозат-оксидоредуктазы с синтетическим геном глифозат-оксидоредуктазы, предназначенным для повышенной экспрессии в растениях. Подвергнутый обработке ген глифозат-оксидоредуктазы показан в виде верхней ДНК последовательности.

На фиг. 5 показано строение рMON17032 - рMON1886 вектора, содержащего модифицированный ген глифозат-оксидоредуктазы, внедренный в

виде En-CaMV35S -модифицированной глифозат-оксидоредуктазы-NOS-3'-кассеты в NotI сайт вектора. Описание вектора pMON886 можно найти в тексте.

На фиг. 6 приведена нуклеотидная последовательность ХТП1 хлоропластного транзитного пептида, происходящего из *A.thaliana* SSUIA гена.

На фиг. 7 приведена генетическая/структуральная карта плазмиды pMON17066 - вектора pMON979 типа, содержащего слитый полипептид ХТП/синтетическая глифозат-оксидоредуктаза. Родственными pMON979 типу производными являются pMON17065 и pMON17073.

На фиг. 8 приведена генетическая/структуральная карта плазмиды pMON17138, являющейся примером вектора pMON981 типа, содержащего ген, кодирующий слитый полипептид ХТП/синтетическая глифозат-оксидоредуктаза. В данном примере ген ХТП1-синтетической глифозат-оксидоредуктазы клонирован в pMON979 в виде XbaI-BamHI фрагмента.

На фиг. 9 приведена нуклеотидная последовательность ХТП2 хлоропластного транзитного пептида, происходящего из *A.thaliana* EPSPS гена.

На фиг. 10 приведена структуральная карта плазмиды pMON17159.

На фиг. 11 приведена структуральная карта плазмиды pMON17226.

На фиг. 12 приведена структуральная карта плазмиды pMON17164.

Экспрессия растительного гена, существующего в форме двуниевой ДНК, включает синтез матричной РНК (мРНК) из одной из нитей ДНК при участии фермента РНК-полимеразы и последующую обработку внутри ядра первичного транскрипта мРНК. Такая обработка включает участие 3'-сигнальной области, облегчающей присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК.

Транскрипция ДНК в мРНК регулируется областью ДНК, обычно называемой "промотором". Область промотора содержит последовательность оснований, подающих сигналы РНК-полимеразе связываться с ДНК и инициировать транскрипцию в мРНК использованием в качестве матрицы одной из нитей ДНК с образованием соответствующей комплементарной нити РНК.

В литературе описан целый ряд промоторов, проявляющих активность в клетках растений, в их числе; нопалин-синтетаза (NOS) и октопин-синтетаза (OCS) промоторы (находящиеся на индуцирующих опухоль плаزمидях из *Agrobacterium tumefaciens*), каульмовирусные промоторы, такие как 19S-35S-промоторы мозаичного вируса цветной капусты (CaMV) и 35S-промотор мозаичного вируса норичника (FMV), светочувствительный промотор из малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (SSRUBISCO, очень распространенного растительного полипептида). Все перечисленные промоторы были использованы для создания различного типа ДНК конструктов, экспрессированных в растениях (см., напр., PCT публикацию WO 84/02913 (Pogers и др., Монсанто)).

Промоторы, для которых известна или обнаружена способность вызывать

транскрипцию в клетках растения, могут быть использованы и в настоящем изобретении. Подобные промоторы могут быть получены из различных источников, таких как: растения и растительные ДНК вирусы, в том числе, но без ограничения только ими: CaMV 35S и FMV35S-промоторы и промоторы, выделенные из растительных генов, таких как: гены SSRUBISCO или белки a/b связывания хлорофила. Как показано ниже, рекомендуется, чтобы конкретный выбранный промотор был способен вызывать достаточную экспрессию с продуцированием в результате глифозат-оксидоредуктазы в количестве, эффективном для придания растениям заметной толерантности к глифозатным гербицидам. Количество глифозат-оксидоредуктазы, необходимое для создания целевой толерантности, может меняться в зависимости от вида растения.

Рекомендуется, чтобы используемый промотор характеризовался сравнительно высокой экспрессией во всех меристематических тканях помимо других тканей, поскольку сейчас известно, что глифозат перемещается и накапливается в растительной ткани этого типа. Или же может быть использована комбинация химерных генов с целью кумулятивного создания необходимого общего уровня экспрессии фермента глифозат-оксидоредуктазы с получением в результате толерантного к глифозату генотипа.

мРНК, продуцируемая ДНК конструктом настоящего изобретения, содержит также 5'-нетрансляционную лидер-последовательность. Такая последовательность может происходить из промотора, выбранного для экспрессирования гена, и может быть специально модифицирована с тем, чтобы повысить трансляцию мРНК. 5'-Нетрансляционные области могут быть также получены из вирусных РНК, из приемлемых эукариотных генов или из синтетических генных последовательностей. Настоящее изобретение не ограничено конструктами, представленными в нижеследующих примерах, в которых нетрансляционная область происходит как из 5'-нетрансляционной последовательности, сопутствующей последовательности промотора, так и из части 5'-нетрансляционной области гена белка оболочки вируса. Желательно, чтобы нетрансляционная лидер-последовательность могла происходить из неродственного промотора или кодирующей последовательности, о чем речь шла выше.

Рекомендуемым для использования в настоящем изобретении промотором является полной длины транскриптный (35S) промотор мозаичного вируса норичника (FMV), действующий как сильный и однородный промотор для химерных генов, вводимых в растения, в частности, двудольные растения. В целом, полученные трансгенные растения экспрессируют белок, кодируемый введенным геном на более высоком и равномерном уровне во всех тканях и клетках, чем тот же самый ген, ведомый усиленным CaMV 35S-промотором. ДНК последовательность промотора (см. фиг. 1) расположена между нуклеотидами 6368 и 6930 (ПОСЛЕД. N 1) FMV генома. Рекомендуется, чтобы с промотором

сочеталась 5'-нетрансляционная лидер-последовательность, и пример лидер-последовательности приведен на фиг. 1 (ПОСЛЕД. N 2). Лидер-последовательность может происходить из того же FMV генома или же может происходить из источника, отличного от FMV.

3'-нетрансляционная область химерного растительного гена содержит сигнал полиаденилирования, действие которого в растениях вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК. Примеры приемлемых 3'-областей включают: (1) 3'-транскрибированные, нетрансляционные области, содержащие сигнал полиаденилирования из *Agrobacterium* индуцирующих опухоль (Ti) плазмидных генов, таких как ген нопалин-синтетазы (NOS), и (2) растительные гены, такие как гены белков хранения сои и ген малой субъединицы рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (ssRUBISCO). Пример рекомендуемой 3'-области представлен областью из ssRUBISCO гена гороха (E9), более подробно раскрытая в нижеследующих примерах.

ДНК конструкторы настоящего изобретения кроме того содержат структуральную кодирующую последовательность в форме двунитевой ДНК, кодирующую фермент глифозат-оксидоредуктазы, превращающий глифозат в аминометилфосфонат и глиоксилат.

Краткие сведения о реакциях глифозат-оксидоредуктазы

Фермент глифозат-оксидоредуктаза катализирует расщепление C-N связи глифозата с образованием в качестве продуктов реакции аминометилфосфоната (АМФК) и глиоксилата. В аэробных условиях кислород участвует в реакции в качестве сосубстрата. Другие доноры электронов, такие как: метосульфат феназина и убихинон в аэробных условиях стимулируют реакцию. В отсутствие кислорода указанные соединения действуют, как акцепторы электронов.

Анализ на ферментативную реакцию может быть выполнен по поглощению кислорода с помощью кислородного электрода. Глифозат-оксидоредуктаза из LBAA не образует перекиси водорода в качестве продукта восстановления кислорода. Данный фермент требует стехиометрически двух молей окисленного глифозата на моль потребленного кислорода с образованием в качестве продуктов реакции по два моля каждого АМФК и глиоксилата.

Альтернативный метод анализа глифозат-оксидоредуктазы включает реакцию образца с 2,4-динитрофенилгидразином и определение количества глиоксилат-2,4-динитрофенилгидразона с помощью ВЭЖХ-анализа, более подробно описанного в последующем разделе.

Третий метод анализа глифозат-оксидоредуктазы заключается в использовании $^3\text{-}^{14}\text{C}$ -глифозата в качестве субстрата, при этом образуемый ферментом радиоактивный АМФК отделяют от субстрата с помощью ВЭЖХ на анионообменной колонке по нижеприведенной методике. Связанная с АМФК радиоактивность является мерой глубины реакции глифозат-оксидоредуктазы.

Глифозат-оксидоредуктаза из LBAA относится к флавопротеинам с участием ФАД в качестве софактора. Один из механизмов,

предложенных нами для реакции, катализируемой данным ферментом, включает восстановление ФАД по активному сайту фермента глифозатом. Это приводит к образованию восстановленного ФАД и основания Шиффа аминометилфосфоната с глиоксилатом. Основание Шиффа гидратируется водой и гидролизуется до его компонентов: АМФК и глиоксилата. Восстановленный флаavin вновь окисляется молекулярным кислородом. Мы полагаем, что в процессе повторного окисления восстановленного ФАД в качестве промежуточного продукта образуется окисленный флаavin. Промежуточный флаavin может катализировать окисление глифозата с образованием АМФК и глиоксилата. Данная гипотеза согласуется с наблюдаемой стехиометрией и невозможностью обнаружить нами в реакционной смеси перекись водорода.

Помимо глифозата глифозат-оксидоредуктаза из LBAA окисляет иминодиуксусную кислоту (ИДУ) до глицина и глиоксилата. Скорость реакции с ИДУ значительно быстрее, чем с глифозатом.

Выделение бактерий, эффективно разлагающих глифозат до АМФК

Бактерии, способные разлагать глифозат, известны (Hallas и др., 1988; Malik и др., 1988). Ряд таких бактерий отобран для быстрого разрушения глифозата следующим путем. Двадцать три бактериальных изолята перенесены с TSA-пластинок (Триптиказный соевый агар, BBL) в среду А, состоящую из среды с солями Дворкина-Фостера, содержащей глюкозу, глюконат и цитрат (каждый в концентрации 0,1%) в качестве источника углерода и содержащей глифозат в качестве источника фосфора (концентрация глифозата 0,1 мМ).

Минимальную среду Дворкина-Фостера готовят смешиванием в 1 л обработанной в автоклаве воды по 1 мл каждого из компонентов А, В и С и 10 мл компонента D, тиамин \cdot HCl (5 мг), С-источников до конечной концентрации в 0,1% каждого и Р-источника (глифозат или иной фосфонат, или Pi) до необходимой концентрации.

А. Соли Д-Ф (1000X партия, на 100 мл, с обработкой в автоклаве):

H_3BO_3 - 1 мг

$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1 мг

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12,5 мг

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 8 мг

$\text{NaMoO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 1,7 мг

В. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1000X партия, на 100 мл, с обработкой в автоклаве) 0,1 г;

С. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1000X партия, на 100 мл, с обработкой в автоклаве) 0,1 г;

Д. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1000X партия, на 100 мл, с обработкой в автоклаве) 20 г.

Е. Дрожжевой экстракт (УЕ, Дифко) добавляю до конечной концентрации 0,01-0,001%.

Кроме того, каждый 1 мл культурной среды содержит примерно 200000 срм $^3\text{-}^{14}\text{C}$ -глифозата (Амерсхам, CFA-745). Культуры инкубируют с встряхиванием при 30 °C. Изоляты LBAA показали значительный рост в первый день, в то время как другие испытываемые культуры показали незначительный рост до третьего дня. Определение радиоактивности (сцинтилляционный счетчик) в культуре,

клеточных дебрис и надосадочной жидкости культуры (на четвертый день) показали общее снижение ¹⁴C-радиоактивности и распределение остаточной радиоактивности в отношении 1:1 в надосадочной жидкости и дебрис, что указывает на произошедший значительный метаболизм глифозата с его поглощением (см. табл. I).

На пятый день 75 мкл надосадочной жидкости всех испытуемых культур анализируют с помощью ВЭЖХ следующим образом. Применяют анионообменную колонку СИНХРОПАК[®] АХ100 (Р. J.Cobert), подвижная фаза состоит из 65 мМ КН₂РО₄ (рН 5,5 добавлением NaOH, в зависимости от требований эксперимента для изменения времен удерживания материала концентрацию фосфатного буфера меняют в пределах 50-75 мМ), режим изократный и элюируемый продукт регистрируют непрерывно с помощью детектора радиоактивности. Данным анализом выявлено, особенно в одном из изолятов (LBAA) полное отсутствие пика глифозата (Время удерживания /ВУ/ = 7 мин в данном анализе) и появление нового пика радиоактивности с тем же временем удерживания, что у метиламина или N-ацетилметиламина (ВУ = 3,5 мин). Охарактеризована коллекция бактерий, в которую входит и штамм LBAA, как разрушающих глифозат до АМФК (Hallas и др., 1988), обнаружение метиламина или N-ацетилметиламина предполагает, что АМФК или N-ацетил АМФК были метаболизированы за счет активности LBAA "С-Р-лиазы" с выделением фосфата, необходимого в данном эксперименте для роста культуры. Штамм LBAA исследован более подробно.

Превращение глифозата в АМФК в микробильных изолятах

Для четкости и краткости описана нижеследующая методика выделения генов, кодирующих фермент глифозат-оксидоредуктазу, дается для выделения подобного гена из бактериального изолята (LBAA). Для специалиста очевидно, что такая же или аналогичная стратегия может быть использована для выделения таких генов из других микробильных изолятов.

Путь разрушения глифозата охарактеризован на покоящихся клетках выращенного в присутствии глифозата штамма LBAA следующим образом. Клетки из культуры LBAA (100 мл) выращивают в DF среде с глюкозой, глюконатом и цитратом в качестве источников углерода, с тиаминном и дрожжевым экстрактом (0,01%) для поступления следовых добавок (=DF3S среде) и с 0,2 мМ глифозата в качестве источника фосфора, собирают при значении Klett = 200, промывают дважды 20 мл DF3S среды и эквивалент в 20 мл клеток повторно суспендируют в 100 ul той же среды, содержащей /3-¹⁴C/-глифозат (2,5 ul с радиоактивностью 52 мCi/ммоль). Клеточную смесь инкубируют со встряхиванием при 30°С и через промежутки времени отбирают образцы (20 мл). Образцы центрифугируют и как надосадочную жидкость, так и клеточные дебрис анализируют с помощью ВЭЖХ (дебрис вновь суспендируют в 100 ul кислой DF3S среды /DF3S, 0,65 н. HCl/, кипятят 5 мин, недолго центрифугируют и надосадочную

жидкость анализируют; подкисленный контроль с глифозатом также анализируют). За 2 ч количество радиоактивности в пике глифозата (ВУ = 7,8 мин) из надосадочной жидкости уменьшилось до -33% от исходного уровня, примерно 3% глифозата обнаружено в клетках. Продукт, элюирующийся совместно с метиламином в качестве стандарта, составил -5% от исходных показаний счетчика для надосадочной жидкости и -1,5% для дебрис. Новый пик, составивший -1,5% от исходной радиоактивности при ВУ = 7,7 мин (ВУ глифозата = 8,9 мин при подкислении в данном эксперименте), идентифицирован в клеточном содержимом. Большое уменьшение общей радиоактивности также предполагает, что в данном эксперименте глифозат подвергается интенсивному метаболизму. Такой путь метаболизма получил дополнительное освещение в опыте, в котором метаболизм /¹⁴C/-АМФК сравнивался с метаболизмом /3-¹⁴C/-глифозата (см. выше) в покоящихся клетках, собранных при значении Klett = 165 и вновь суспендированных при эквиваленте в 15 мл клеток на 100 ul DF3S среды. Образцы, анализируемые с помощью ВЭЖХ, состоят из полных культур, подкисленных и обработанных вышеописанным способом. В первые 2 ч опыта с глифозатом 25% радиоактивности обнаруживаются в пике метиламин/N-ацетилметиламин (ВУ = 4,8 мин), 12,5% в виде пика АМФК (ВУ = 6,4 мин), 30% в виде пика, указанного выше (ВУ = 9,4 мин) и 30% в виде пика глифозата (ВУ = 11,8 мин). В опыте с АМФК 15% радиоактивности обнаружено в виде N-ацетилметиламина/метиламина, 59% в виде АМФК и 18% в виде пика с ВУ = 9,4 мин. Модифицированная форма АМФК идентифицирована, как N-ацетил-АМФК. Вывод об аналогичной стадии ацетилирования сделан на основе продуктов, идентифицированных в E.coli, выращенной в аминометилфосфонатах в качестве единственного источника Р (Avita и др., 1987). Полученные данные указывают на следующий путь разложения глифозата в LBAA: глифозат ---> АМФК (---> метиламин)---> N-ацетилАМФК ---> N-ацетилметиламин.

Клонирование гена-(ов)

глифозат-оксидоредуктазы в E.coli
После установления превращения глифозата в АМФК в штамме LBAA был изучен общий подход клонирования в E.coli гена-(ов), участвующего в подобном превращении. Клонирование и генные технологии, если нет особых указаний, соответствуют в целом ранее опубликованным (Maniatis и др., 1982). Стратегия клонирования заключалась в следующем. Введение космидного банка штамма LBAA в E.coli и отбор на ген-(ы) превращения глифозата в АМФК определялись ростом на глифозате в качестве источника фосфора (Р). Отбор основывался на применении АМФК, образованным ферментом метаболизма глифозата, в качестве источника Р с последующим выделением из АМФК под действием E.coli "С-Р-лиазы" неорганических фосфатов (Pi). Большинство штаммов E.coli неспособны усваивать фосфонаты в качестве источника Р в исходном состоянии, однако, такие штаммы быстро адаптируются

(независимо от *RecA*) и усваивают фосфонаты (становятся $Mpru^+$) (Wackett и др. 1987b). *E. coli Mpru^+* выделен из *E. coli* SR200 (Leu^- , Pro^- , *recA*, *hsdR*, *supE*, Sm^r , *tonA*) следующим образом. Аликвоты свежей культуры *E. coli* SR200 в 1-бульоне наносят на MOPS (Neidhardt и др., 1974) полный агар (т. е. содержит L-лейцин и L-пролин в концентрации 25 $\mu\text{g}/\text{мл}$ и витамин B1 /тиамин/ в концентрации 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$; агар - ДИФКО "Очищенный"), содержащий в качестве источника Р аминотетилфосфонат (АМФК, 0,2 мМ, Сигма),

MOPS среда включает:

10 мл 10X MOPS солей

2 мл 0,5 мг/мл Тиамин•HCl

1 мл 20% глюкозы

10X MOPS соли включает:

на 100 мл

40 мл 1M MOPS, pH 7,4

4 мл 1M Трицина, pH 7,4

1 мл 0,01M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 мл 1,9M NH_4Cl

1 мл 0,276 M K_2SO_4

1 мл 0,5 мМ CaCl_2

1 мл 0,528 M MgCl_2

10 мл 5 M NaCl

1 мл 0,5% L-Метионина

1 мл питательных микродобавок

В число микродобавок входят:

$3 \cdot 10^{-9}$ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mn}_7\text{O}_{24}$

$4 \cdot 10^{-7}$ M H_3BO_4

$3 \cdot 10^{-8}$ M CoCl_2

$1,6 \cdot 10^{-8}$ M CuSO_4

$8 \cdot 10^{-8}$ M MnCl_2

$1 \cdot 10^{-8}$ M ZnSO_4

Шесть отдельных колоний собирают с пластинок с агаром после трехдневного инкубирования при 37 °С и наносят в виде штрихов на MOPS полный агар, содержащий в качестве источника Р либо АМФК, либо метилфосфонат (Альфа). Одна колония, обозначенная как *E. coli* SR200 $Mpru^+$, выбрана из тех колоний, которые в равной степени и однородно росли на обоих фосфонатных средах.

Хромосомную ДНК получают из штамма LBAA следующим путем. Дебрис из 100 мл поздней *log*-фазы культуры LBAA в L-бульоне (Miller, 1972) вновь суспендируют в 10 мл Раствора 1 (Birboim и Doly, 1979). Добавляют НДС до конечной концентрации в 1% и суспензию подвергают трем циклам замораживания-оттаивания, каждый из которых заключается в погружении на 15 мин в сухой лед и в воду на 10 мин при 70 °С. Лизат затем экстрагируют четыре раза равными объемами смеси фенол-хлороформ (1:1, фенол насыщен ТЕ) (ТЕ = 10 мМ Трис с pH 8; 1 мМ ЭДТК) и фазы разделяют центрифугированием (15000 G, 10 мин). Осаждаемый этанолом продукт получают из надосадочной жидкости в виде дебриса непродолжительным центрифугированием (8000 G, 5 мин) после добавления двух объемов этанола. Дебрис вновь суспендируют в 5 мл ТЕ и диализуют 16 ч при 4 °С в 2 л ТЕ. В результате получено 6 мл раствора ДНК в концентрации 150 мкг/мл.

Частично рестриктированную ДНК получают следующим образом. Три аликвотных образца по 100 мкг LBAA ДНК

обрабатывают 1 ч при 37 °С эндонуклеазой рестрикции HindIII в количестве соответственно 4,2 и 1 ферментных единиц/мкг ДНК. Образцы ДНК объединяют, добавляют ЭДТК до концентрации 0,25 мМ и экстрагируют равным объемом фенол-хлороформ. После добавления NaАцетата и этанола ДНК осаждается двумя объемами этанола и отделяется в виде дебриса центрифугированием (12000 G, 10 мин). Высушенные дебрис ДНК вновь суспендируют в 500 мкл ТЕ и расслаивают на 10-40% градиенты сахарозы (5% приращение по 5,5 каждый раз) в 0,5 M NaCl, 50 мМ Трис с pH 8, 0,5 мМ ЭДТК. После центрифугирования в течение 20 ч со скоростью 2600 об/мин в SW28 роторе пробирки пунктируют и отбирают фракции по 1 мл. Пятнадцать мкл образца из каждой третьей фракции пропускают на 0,8% геле агарозы и размер ДНК определяют сравнением с линейной лямбда-ДНК и HindIII-гидролизованной лямбда-ДНК в качестве стандартов. Фракции, содержащие ДНК в виде фрагментов в 25-35 к.о., объединяют, обессоливают на колонках АМИКОН10 (7000 об./мин, 20 °С, 45 мин) и концентрируют осаждением. По этой методике получено 50 μg LBAA ДНК необходимого размера.

Плазмидную рNC79 (Hohn и Collins, 1980) ДНК и вектор, обработанный HindIII-фосфатазой, получают по литературной методике (Maniatis и др., 1982). Лигация проводилась в следующих условиях:

Векторная ДНК (обработана HindIII и щелочной фосфатазой теленка) - 1,6 мкг
Фракционированные по размеру LBAA HindIII фрагменты - 3,75 мкг

10X буфер лигации - 2,2 мкл

250 мМ Трис-HCl, pH 8

100 мМ MgCl_2

100 мМ дитиотреитола

2 мМ спермидина

T4 ДНК-лигаза (Бозрингер-Маннхэйм) (400 ед./ μl) - 1 мкл

H_2O - До 22 μl

18 ч при 16 °С.

Подвергнутую лигации ДНК (4 мкл) упаковывают в частицы лямбда-фага (Стратаген, Гигпак Гоулд) использованием методики изготовителя.

E. coli SR200 $Mpru^+$, выращиваемую около суток в L-бульоне (с 0,2% мальтозы), заражают 50 мкл упакованной ДНК. Трансформанты отбирают на MOPS полном агаре плюс ампициллин и с глифозатом (0,2 мМ) в качестве источника Р.

Для титрования упакованных космид аликвотные образцы также наносят на MOPS (Neidhardt и др., 1974) полный агар плюс ампициллин, содержащий Pi (1 мМ). Космидные трансформанты выделяют спустя 2 дня при 37 °С на той же среде при отношении - 10^{-5} на мкг/LBAA HindIII ДНК. Колонии возникают на глифозат-агаре в интервале от дня 3 до дня 10 с конечным отношением 1 на 200-300 космид. Плазмидную ДНК получают из двадцати одного космидного трансформанта, отобранных с глифозатных пластинок. Данные космиды, основываясь на характере HindIII рестрикции плазмидной ДНК, можно разделить по меньшей мере на два

класса. Общими для космид класса I являются клонированные фрагменты HindIII рестрикции в 6,4 и 4,2 к.о., для класса II общим является фрагмент в 23 к.п. о. Десять космид, представляющие отклонения от клонированных фрагментов, вновь трансформируют с *E.coli* SR200 Mpu⁺ и способность усваивать глифозат проверяют отбором путем выращивания на пластинках с MOPS полным агаром плюс ампициллин плюс глифозат. Кроме того определяют конечную плотность клеток, достигаемую культивированием в присутствии глифозата (0,2 мМ в MOPS среде) в качестве источника P, при этом между различными трансформантами удалось обнаружить лишь небольшие отличия. Трансформантами также инокулируют MOPS полный бульон с АМФК в концентрации 0,1 мМ в качестве источника P (для подтверждения наличия активности "С-Р-лиазы) и после выдерживания 24 ч при 37 °С разбавляют 100-кратно MOPS полной средой с глифозатом в концентрации 0,1 мМ и /3-¹⁴C/-глифозатом (40000 срм/мл). Все содержащие космиду клетки разрушают глифозат и образуют N-ацетилАМФК и N-ацетилметиламин без заметной разницы в скорости. В данных испытаниях N-ацетилАМФК обнаружен в надосадочной жидкости культуры. Одна космида класса I, идентифицированная как rMON7468, выбрана для дальнейшего исследования. Второй ген глифозат-оксидоредуктазы идентифицирован в космидном клоне класса II.

Бесклеточные лизаты *E. coli* SR200 Mpu⁺/rMON17468 получены из клеток, выращенных на MOPS полной среде с глифозатом в концентрации 1 мМ (и с добавками L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана, концентрация каждого 100 мкг/мл, а также p-аминобензойной кислоты, p-гидроксibenзойной кислоты и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, концентрация каждой 5 мкг/мл для сведения к минимуму ингибирующего действия *E.coli* ЕПФП-синтетазы). Дебрис (масса примерно 0,5 г во влажном состоянии) вновь суспендируют 1 мл лизисного буфера (40 мМ MOPS с pH 7,4, 4 мМ трицина с pH 7,4, 10% глицерина, 1 мМ ДТТ) и дважды пропускают через французский пресс. Клеточные дебрис удаляют центрифугированием 10 мин при 15000 об./мин. Надосадочную жидкость после добавления MgCl₂ до концентрации 10 мМ анализируют на разрушение радиомеченного глифозата. Глифозат в качестве субстрата поставляется в виде /3-¹⁴C/-глифозата (конечная концентрация = 17 мкМ). Выявленными продуктами являются преимущественно АМФК и некоторое количество N-ацетилАМФК; образование АМФК указывает на клонирование ферментативной активности из штамма LBAA, однако образование N-ацетилАМФК может быть вызвано эндогенной *E.coli* активностью (Avila и др., 1987). Удельная активность для образования в этих условиях АМФК составляет 13,3 пмоля АМФК/мин•мг белка.

Характеристика гена превращения глифозата в АМФК

Затем в космиде локализируют клонированную область, ответственную за ферментативную активность глифозат-оксидоредуктазы. Выделяют

делеции rMON7468 преимущественно в пределах клонированной области использованием ферментов рестрикции, обрезающих внутри вставки случайным образом, применением следующей методики. Образцы плазмидной ДНК по 0,5-2 мкг полностью гидролизуют следующими эндонуклеазами рестрикции; NotI, SacI, BglII или BamHI, экстрагируют смесью фенол-хлороформ, осаждают этанолом, вновь суспендируют в TE буфере и подвергают лигации 2-4 ч при комнатной температуре (или 18 ч при 16°C) в конечном объеме 50 мкл с буфером лигации и T4 ДНК-лигазой. Трансформанты отбирают в *E.coli* SR200 Mpu⁺ и эти делеции исследуют на потерю или сохранение фенотипа усвоения глифозата. Эти данные в сочетании с рестрикционным картированием клонов использованы для локализации активной области, оказавшейся вблизи центральной части вставки в rMON7468, включающей два общих HindIII фрагмента (6,4 и 4,2 к.о.). HindIII рестрикционные фрагменты из этой области затем субклонировали в pBlueScript (Стратеген) и их глифозатный фенотип определяют в *E.coli* JM101 Mpu⁺ (Mpu⁺ производное JM101 выделено по методике выделения SR200 Mpu⁺). Клоны, содержащие HindIII фрагмент в 6,4 к.о., в любой ориентации дают усвоение глифозата. После рестрикционного картирования данного HindIII фрагмента из двух HindIII клонов в 6,4 к.о. использованием ферментов, обрезающих вставку, а также область полилинкера случайным образом, выделен ряд клонов делеции. Кроме того субклонировано несколько рестрикционных фрагментов, внутренних по отношению к HindIII фрагменту. PstI (3,5 к. о.) и BglII (2,5 к.о.) фрагменты в любой ориентации оказались положительными на усвоение глифозата. Эти данные в сочетании с данными делеции использованы для локализации активной области, оказавшейся BglII-XhoI фрагментом примерно в 1,8 к.о. Кроме того, делеции, выделенные из HindIII фрагмента в 6,4 к.о., указывают на минимальный размер кодирующей области около 0,7 к.о., при этом *E.coRI* и *SacI* сайты, вероятно, расположены в пределах кодирующих последовательностей.

Направление транскрипции/экспрессии локуса, ответственного за ферментативную активность превращения глифозата в АМФК, определяют следующим образом. *E. coli* JM101 Mpu⁺ трансформанты из rMON7469 #1 и #4 (клоны 2,5 к.о. BglII фрагмента в BamHI сайте pUC118 с противоположной ориентацией) выращивают в M9-глюкоза-тиамин-ампициллин бульоне в присутствии и отсутствии Plac индуктора IPTG, собирают в поздней log-фазе (Klett = 109-220), по вышеприведенной методике получают бесклеточные лизаты четырех культур и анализируют на активность превращения глифозата в АМФК при концентрации глифозата 1,7 мкМ. Наибольшая ферментативная активность получена для rMON7468 #1 плюс IPTG, где XhoI сайт доставлен относительно Plac, что предполагает экспрессирование гена-(ов) в направлении от BglII к XhoI (см. табл. II).

Единственным выявленным продуктом был АМФК, что предполагает индуцирование в

E. coli трансформантах, выращенных на глифозате в качестве источника Р, ранее описанной АМФК ацетилирующей активности.

В более позднем эксперименте клеточные лизаты из рМОН7468 #1 и рМОН7470 (BglIII-XhoI 1,8 к.о. в рUC118, образован из рМОН7469 #1 делецией ~700 п.о. XhoI-Sall фрагмента) на активность по превращению глифозата в АМФК при концентрации глифозата 2 мМ /уд. акт. /3-¹⁴C/-глифозата = 3,7 мCi/ммоль, 0,2 мCi/реакцию, культуры выращивают в присутствии в среде ИПТГ, при этом зарегистрирована более высокая ферментативная активность, что отражает улучшенные условия анализа (см. табл. III).

Белки, кодируемые BglIII фрагментом, определяют *in vivo* использованием Т7 экспрессионной системы (Tabor и Richardson, 1985) после клонирования указанного фрагмента в BamHI сайт вектора рBlue Script (+) (рМОН7471 #1, #2, ориентации противоположны). Испытуемые и контрольные плазмиды трансформируют в *E. coli* K38, содержащем рGPI-2 (Tabor и Richardson, 1985) и выращивают при 30°C в L-бульоне (2 мл) в присутствии ампициллина и канамицида (100 и 50 мкг/мл соответственно) до значения Klett ~50. Отбирают аликвоту, клетки отделяют центрифугированием, промывают М9 солями (Miller, 1972) и вновь суспендируют в М9 среде (1 мл), содержащей 0,2% глюкозы, 20 мкг/мл тиамина и 18 аминокислот в концентрации 0,01% (минус цистеин и метионин). После инкубирования 90 мин при 30°C культуры переносят в нагретую до 42°C водяную баню и выдерживают 15 мин. Добавляют рифампицин (Сигма) до концентрации 200 мг/мл, культуры выдерживают еще 10 мин при 42°C и затем 20 мин при 30°C. Образцы пульс обрабатывают 5 мин при 30°C ³⁵S-метионином (10 мк Ci), клетки отделяют центрифугированием и суспендируют в 60-120 мкл крекинг-буфера (60 мМ Трис-НСl с рН 6,8/1% НДС/1% 2-меркаптоэтанола/10% глицерина/0,01% бромфенол голубого). Аликвоты образцов подвергают электрофорезу на 12,5% НДС-ПАГЭ и после вымачивания 60 мин в 10 объемах смеси уксусная кислота-метанол-вода (10: 30: 60) гель вымачивают в ЭНЛАЙТНИНГ[®] (ДЮПОНТ) согласно указаниям изготовителя, сушат и экспонируют на рентгеновской пленке при -70 °C. Белки, меченные ³⁵S-метионином, обнаруживаются только для направления от BglIII к XhoI, и самый крупный из них имеет размер около 45 кД. Когда BglIII-XhoI фрагмент исследуют после клонирования в BamHI-XhoI сайты рBlue Script (с образованием рМОН7472), то и в этом случае такой белок в ~45 кД тоже экспрессируется.

Влияние экспрессии активности по превращению глифозата в АМФК на глифозатную толерантность *E. coli* вначале определяют изучением роста рекомбинантов в среде, содержащей ингибирующие концентрации глифозата. В испытании сравнивают рост *E. coli*

JM101, содержащего контрольный вектор (рUC118; Viera, и Nessing, 1987) или рUC118 клоны BglIII фрагмента в 2,5 к.о. (рМОН7469 #1, #4). Наблюдается очень четкая корреляция между способностью усваивать глифозат и

толерантность к глифозату. Такой генотип толерантности (устойчивость к 1,5 мМ глифозата) затем используют в качестве сита для быстрого определения фенотипа клонов делеции, таких как рМОН7470 (BglIII-XhoI 1,8 к.о. в рUC118, образован из рМОН7469 #1 делецией ~700 п.о. XhoI-Sall фрагмента) и последующих клонов.

Нуклеотидная последовательность структурального гена

глифозат-оксидоредуктазы

Нуклеотидную последовательность BglIII-XhoI фрагмента (ПОСЛЕД. N 3) определяют использованием одностебчатых ДНК матриц (созданы использованием фагемидных клонов и "хелпера" M13 фага R408) и продажного набора

СЕКВЕНАЗА[®] (Интернейшнл

Биотехнолоджис. Инк.). Компьютерный анализ последовательности (ПОСЛЕД. N 3) выявил единственную большую открытую рамку считывания (ОРС) в направлении от BglIII к XhoI (см. фиг. 2), включающую

месторасположение отдельных соответствующих сайтов рестрикции.

Предполагаемый стоп-кодон (UAA) расположен в 2 п.о. 5' от Scal сайта

рестриционного обрезания. Данные, подтверждающие то, что UAA-кодон является

терминационным коконом в ~ 45 кД ОРС, получены на основании следующего. Ранее на

основании фенотипа усвоения глифозата определено, что 3'-границы расположены

между SacI сайтом (95 п.о. в восходящем направлении от Scal сайта) и XhoI сайтом.

При клонировании BglIII-ScaI фрагмента в BamHI-SmaI сайты рBlue Script и

экспрессировании белков *in vivo* все равно получают белок размером ~45 кД. BglIII-ScaI

фрагмент затем повторно клонируют из такого рBlue Script клона в виде XbaI-HindIII в

вектор рUC118 XbaI-HindIII, что, как найдено, придает устойчивость к 15 мМ

глифозата трансформантам *E. coli* JM101. На основании этих данных месторасположение

С-окончания белка размером ~45 кД находится между SacI и Scal сайтами.

Единственным стоп-коконом в любой рамке считывания, который находится между

указанными сайтами, может быть кодон, находящийся непосредственно в восходящем

направлении от Scal сайта.

Имеются два метиониновых кодона (AUG, расположены в положениях 120 и 186),

которые при использовании как fMet должны были бы привести к белкам размерами 46, 140

и 44,002 кД соответственно, но ни одному из них не предшествовала четко распознаваемая

последовательность Шайн-Дельгарно.

Начало белка более точно очерчено следующим образом. Последовательности,

распознающие сайт рестрикции BglIII, введены в положениях, находящихся в восходящем

направлении от потенциальных старт-кодонов, сайт-направленным мутагенезом рМОН7470

замещением AGATCT на последовательности AGACTG ("Bg120") и GTATCG ("Bg186) в 21 и 9

п.о. в восходящем направлении от AUG₁₂₀ и AUG₁₈₆ соответственно. За исключением

особо отмеченных случаев олигонуклеотидные примеры для мутагенеза

представляют собой последовательности, подлежащие фланкированным изменениям

8-10 гомологичными основаниями с каждой стороны. Толерантность к глифозату

определена для мутированных клонов. Введение BglII сайта в восходящем направлении от AUG₁₂₀ не оказало воздействия на толерантность к глифозату, но была ликвидирована мутагенезом с введением BglII сайта в восходящем направлении от AUG₁₈₆. Действие обоих случаев мутагенеза на белок размером ~45 кД определено субклонированием мутированных последовательностей в T7 экспрессионные вектора использованием в полилинкере плазмиды pMON7470 сайта KpnI, находящегося сразу же в восходящем направлении от исходного BglII сайта и нисходящего HindIII сайта. Этот полный фрагмент реклонирован в p18UT3T7 (ФАРМАЦИЯ) KpnI - HindIII и испытан in vivo по вышеприведенной методике. И в этом случае белок размером ~ 45 кД экспрессировался и в сравнимых количествах из обоих "BglII" мутагенизированных последовательностей. При использовании новых BglII сайтов в виде 5'-концов (и нисходящего HindIII сайта) для клонирования в pBlue Script BamHI-HindIII сайты белок размером ~ 45 кД экспрессировался, если новый BglII сайт в восходящем направлении от AUG₁₂₀ служил в качестве 5'-конца, но не в том случае, когда тот же сайт был расположен в восходящем направлении от AUG₁₈₆ и являлся 5'-концом. Эти данные служат очень сильным основанием того, что AUG₁₂₀ (или какой-то кодон, расположенный очень близко к нему) является N-окончанием белка глифозат-оксидоредуктазы. BglII сайт, введенный в восходящем направлении от AUG₁₈₆, не приводит к преждевременно терминированному или неустойчивому белку, на основании чего можно предположить, что предсказания в результате такого мутагенеза в кодирующей последовательности (Val₁₈-Cys₁₉--->Arg₁₈-Ala₁₉) оказали тяжелые последствия на активность фермента.

Дополнительные данные, подтверждающие расположение N-окончания, получены введением по отдельности последовательности распознавания NcoI сайта рестрикции (CCATGG на STATGT; замена во втором кодоне серина на аланин) или NdeI последовательности (CATATG на GSTATG) у AUC₁₂₀ и экспрессированием этой ОРС с помощью эффективных E.coli векторов экспрессии. Экспрессия NdeI варианта более подробно излагается ниже. NdeI-HindIII фрагмент, начинающийся у предполагаемого AUG кодона, клонируют в pMON2123 (NdeI-HindIII) с заменой ompF-IGF-I слитого фрагмента (Wong и др., 1988). Полученный клон вводят в E. coli JM101 и клетки индуцируют 2 ч налидиксиновой кислотой по описанной методике (Wong и др., 1988). Полученный не различим на ДС-ПАГЭ по размеру от белка размером ~ 45 кД, а клеточный лизат из индуцированной культуры обладает удельной активностью глифозат-оксидоредуктазы в 12,8 ммоль АМФК/мин•мг. При сравнении в отдельном опыте никакой разницы в глифозат-оксидоредуктазной активности не наблюдалось, если вторым кодоном был аланин, а не серин. Структуральная ДНК последовательность для фермента глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 4) начинается у нуклеотида 120 и кончается у

нуклеотида 1415 BglII-XhoI фрагмента (см. фиг. 2) и фермент глифозат-оксидоредуктаза состоит из 431 аминокислоты (ПОСЛЕД. N 5).

Конструирование векторов трансформации растительного гена глифозат-оксидоредуктазы

5 Для облегчения манипуляций со структуральным геном глифозат-оксидоредуктазы внутренние последовательности распознавания сайтов EcoRI и NcoI удаляют сайт-направленным мутагенезом с замещением 10 последовательности GAATTT на GAATTC и CCACGG на CCATGG соответственно. Кодирующую последовательность глифозат-оксидоредуктазы, пригодную для введения и экспрессирования в векторах трансформации растений, конструируют 15 следующим образом. NcoI ("Met-Ala") N-окончание связывают с NcoI- и EcoRI-делетированными кодирующими последовательностями и С-окончания подвергают делеции до Scal сайта в серии 20 этапов клонирования использованием внутренних SpnI и EcoRV сайтов рестрикции. На этих этапах BglII расположен непосредственно за NotI сайтом в восходящем направлении, а EcoRI и HindIII сайты 25 располагаются в нисходящем направлении сразу же за стоп-кодоном. Последовательность обработанного таким образом гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) приведена на фиг. 3. Обработанный ген глифозат-оксидоредуктазы тем не менее кодирует белок 30 глифозат-оксидоредуктазу дикого типа. Проведенные манипуляции не меняют аминокислотной последовательности глифозат-оксидоредуктазы. Структуральная последовательность 35 глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) в виде BglII/NcoI-EcoRI/HindIII фрагмента в 1321 п.о. легко клонируется в соответствующую растительную экспрессионную кассету. Такой ген глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) 40 клонируют в виде BglII-EcoRI фрагмента в растительный вектор трансформации и экспрессии pMON979 с образованием PMON17073.

Модификация и повторный синтез генной последовательности глифозат-оксидоредуктазы

50 Ген глифозат-оксидоредуктазы из LBAA содержит последовательности, которые могут оказаться несовместимыми с высокой экспрессией гена в растениях. Такие последовательности включают потенциальные сайты полиаденилирования, которые часто А+Т-обогатены, характеризуются более 55 высоким G+C% по сравнению с теми же показателями, обычными для растительных генов (56% против ~ 50%), отличаются концентрированными участками G и С остатков и кодонами, редко используемыми в растительных генах. Высокий G+C% в гене глифозат-оксидоредуктазы ведет к ряду 60 потенциальных последствий, в том числе: более высокая используемость G или С в третьем положении в кодонах по сравнению с растительными генами и потенциальная способность образовывать сильные шпилечные структуры, которые могут повлиять на экспрессию или стабильность РНК. Снижение содержания G+C в гене глифозат-оксидоредуктазы, разрушение

скоплений G и C, удаление потенциальных последовательностей полиаденилирования и улучшения в использовании кодонов с приближением к более часто встречающемуся в растительных генах может привести к более высокой экспрессии в растениях глифозат-оксидоредуктазы.

В первой фазе данного эксперимента сайт-направленным мутагенезом модифицируют выбранные области гена. Эти модификации направлены в первую очередь (но не исключительно) на снижение G+C% и на разрушение G+C кластеров. Обработанный ген глифозат-оксидоредуктазы вначале реклонировали в фрагмидный вектор pMON7258 в виде NcoI-HindIII фрагмента с образованием pMON17014. Однонитевую ДНК получают из *dut und E.coli* штамма. Семь областей гена модифицируют сайт-направленным мутагенезом использованием перечисленных в Таблице IV праймеров и набора для мутагенеза ВиоРад (Каталожный N 170-3576) по методике, прилагаемой к набору.

Для ясности приведены обратные комплементы настоящих праймеров. Положения оснований в последовательностях, представленных на фиг. 2 и 3, соответствующие праймерам, указаны соответственно первым и вторым рядом цифр.

Строение полученного гена (ПОСЛЕД. N 7) подтверждено секвекс-анализом и его способностью создавать толерантность к глифозату на уровне, сравнимом с контрольным, подвергнутым обработке геном глифозат-оксидоредуктазы. Такой модифицированный ген (ПОСЛЕД. N 7) далее называется "модифицированной глифозат-оксидоредуктазой". G+C% гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) снижен от ~ 56% в обработанном варианте до ~ 57% в модифицированном варианте (ПОСЛЕД. N 7). Сравнение обработанного и модифицированного генов

глифозат-оксидоредуктазы приведен на фиг. 3, где обработанный вариант показан сверху, а изменения, введенные для получения модифицированного варианта, показаны снизу. Такой модифицированный ген глифозат-оксидоредуктазы в виде BglIII-EcoRI фрагмента клонируют в растительную экспрессионную кассету, содержащую E_n-CaMV35S промотор и NOS-3'-последовательности. Такую кассету затем клонируют в виде NotI фрагмента в pMON886 вектор с образованием pMON17032 (фиг. 5).

Синтетический ген глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 8) сконструирован с изменением возможно большего числа несовместимых последовательностей, о которых речь шла выше. Короче, генная последовательность пересмотрена с изъятием возможно большего числа последовательностей или признаков последовательностей (избегая при этом введения ненужных сайтов рестрикции): скоплений G или C числом 5 или более, A+T-обогащенных областей

(преимущественно), которые могут действовать, как сайты полиаденилирования или как потенциальные области дестабилизации РНК, или кодоны, редко встречающиеся в растительных генах. Сравнение обработанного (ПОСЛЕД. N 6) и синтетического (ПОСЛЕД. N 8) генов

глифозат-оксидоредуктазы приведено на фиг. 4, где обработанный ген (ПОСЛЕД. N 6) показан сверху, а изменения, внесенные в синтетический ген (ПОСЛЕД. N 8), показаны снизу. G+C% для синтетического гена глифозат-оксидоредуктазы ~ 51%, а потенциал образования коротких шпильчатых структур высокой энергии снижен. Такой синтетический ген клонируют в виде BglIII-EcoRI фрагмента в pMON979 с образованием pMON1765, предназначенного для введения в растения.

Экспрессия хлоропласт-направленной глифозат-оксидоредуктазы

Мишенью для глифозата в растениях является фермент

5-енолпирувилшкимат-3-фосфат-синтетаза (ЕПШФС), располагающийся в хлоропласте. Хотя глифозат-оксидоредуктазная активность, связанная с цитоплазмой,

снижает/предотвращает достижения глифозатом хлоропласта в трансгенном растении, направление фермента

глифозат-оксидоредуктазы в хлоропласт, как найдено, еще больше уменьшает действие глифозата на ЕПШФ-синтетазу. Многие локализованные в хлоропласте белки

экспрессируются генами ядра в виде предшественников и направляются в хлоропласт хлоропластным транзитным пептидом (ХТП), который удаляется на этапах

импорта. Примеры подобных хлоропластных белков включают: малую субъединицу (SSU) рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RUBIS CO),

5-енолпирувилшкимат-3-фосфат-синтетазу (ЕПШФС), ферредоксин, ферредоксин-оксидоредуктазу,

светоулавливающий комплексный белок I и белок II и тиоредоксин F. Показано *in vivo* и *in vitro*, что нехлоропластные белки могут быть направлены в хлоропласт

использованием слитых белков с ХТП и что ХТП-последовательность достаточна для направления белков в хлоропласт (della-Gioppa и др., 1987).

Белок глифозат-оксидоредуктаза направлялся в хлоропласт созданием слияния между С-окончанием ХТП и N-окончанием глифозат-оксидоредуктазы. В первом примере использован специализированный ХТП,

происходящий из SSU1A гена из *Arabidopsis thaliana* (Timko и др., 1988). Такой ХТП (обозначен как ХТП1) конструируют

сочетанием сайт-направленных мутагенезов. Структура ХТП1 (ПОСЛЕД. N 9) (фиг. 6) включает SSU1A ХТП (аминокислоты 1-55),

первые 23 аминокислоты зрелого SSU1A белка (аминокислоты 56-78), остаток серина (аминокислота 79), новый сегмент, повторяющий аминокислоты 50-56 из SSU1A

ХТП и первые две аминокислоты зрелого белка (аминокислоты 80-87), а также остаток аланина и метионина (аминокислоты (88 и 89). NotI сайт рестрикции расположен у 3'-конца (перекрывает Met кодон), что облегчает

создание точного слияния с 5'-концом глифозат-оксидоредуктазы гена или другого гена. На последнем этапе вводят BglIII сайт в восходящем направлении от N-окончания SSU1A последовательности для облегчения

введения продукта слияния в векторы трансформации растений. Слитый белок встраивают между ХТП1 (ПОСЛЕД. N 9) и обработанной глифозат-оксидоредуктазой

(ПОСЛЕД. N 6) (через NcoI сайт) в pGEM3 \pm f (+) вектор с образованием pMON17034. Такой вектор может быть транскрибирован *in vitro* с помощью SP6-полимеразы и транскрибирован и трансляцией РНК с ^{35}S -метионином с получением продукта, который может быть исследован на импорт в хлоропласты, выделенные из *Lactuca sativa* с помощью методов, описанных ниже (della-Cioppa и др., 1986). Продукт слияния ХТП1-глифозат-оксидоредуктаза затем соединяют с синтетическим геном глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 8) и полученный продукт вводят в виде BglII-EcoRI фрагмента в растительный вектор pMON979 с образованием pMON17138 (фиг. 7). После промежуточного этапа клонирования для создания большего числа сайтов клонирования такой продукт слияния ХТП1-глифозат-оксидоредуктаза клонируют также в виде XbaI-BamHI сайта в pMON981 с образованием pMON17138 (фиг. 8).

Во втором примере продукт слияния ХТП-глифозат-оксидоредуктаза встраивают между *Arabidopsis thaliana* ЕПШФС (Klee и др., 1987) ХТП и синтетическими кодирующими последовательностями глифозат-оксидоредуктазы. *Arabidopsis* ХТП сначала подвергают сайт-направленному мутагенезу с введением SphI сайта рестрикции у сайта обработки ХТП. В результате мутагенеза происходит замена Glu-Lys в указанном месторасположении на Cys-Met. Последовательность такого ХТП, названного ХТП2 (ПОСЛЕД. N 10), приведена на фиг. 9. NcoI сайт синтетического гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 8) заменяют SphI сайтом, перекрывающим Met кодон. На этом же этапе второй кодон превращают в кодон для лейцина. Такое изменение не оказывает видимого влияния на *in vivo* активность глифозат-оксидоредуктазы в *E.coli*. Продукт слияния ХТП2-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза затем клонируют в pBlue Script KS (+) и полученную матрицу транскрибируют *in vitro* с помощью T7-полимеразы, и меченный ^{35}S -метионином продукт, как показано, импортируется с эффективностью, сравнимой с эффективностью импорта продукта слияния ХТП1-глифозат-оксидоредуктаза. Продукт слияния ХТП2-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза затем клонируют в виде XbaI-BamI фрагмента в растительный вектор экспрессии с образованием pMON17164. Структуральная карта этой плазмиды представлена на фиг. 12.

Часть растительного вектора pMON17164 (фиг. 12) состоит из следующих сегментов. Химерного гена устойчивости к канамицину, созданного для экспрессии в растении для возможности отбора трансформированной ткани. Химерный ген состоит из 35S-промотора мозаичного вируса цветной капусты в 0,35 к.о. (P-35S) (Odell и др., 1985), 0,83 к.о. гена неомизин-фосфотрансферазы типа II (KAN) и 0,26 к. о. 3'-нетрансляционной области гена нопалин-синтетазы (NOS3') (Fraleу и др., 1983). ClaI-DraI фрагмента в 0,45 к.о. из рТ 15955 октопин Ti плазмиды, содержащего Т-ДНК левую граничную область (Barker и др., 1983). Сегмента в 0,75 к.о., содержащего источник репликации из RK2 плазмиды (ori-V) (Stalker и др., 1981). Sall-PstI сегмента в

3 к.о. из pBR322, обеспечивающего источник репликации в *E.coli* (ori-322) и дающего *bot* сайт для конъюгационного переноса в клетки *Agrobacterium tumefaciens* фрагмента в 0,93 к.о., выделенного из транспозона T7 и кодирующего устойчивость бактерий к спектиномицину/стрептомицину (Scp/Str) (Fling и др., 1985), который является детерминантной для отбора в *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens*. PvuII-bclI фрагмента в 0,36 к.о. из рТТ37 плазмиды, содержащего Т-ДНК правую граничную область нопалинового типа (Fraleу и др., 1985). Экспрессионной кассеты, состоящей из 0,6 к.о. 35S-промотора из мозаичного вируса норичника (P-FMV) (Cowda и др., 1989), нескольких уникальных сайтов клонирования и 0,7 к.о. 3'-нетрансляционной области *gbcS-E9* гена гороха (E9 3') (Coruzzi и др., 1984 и Morelli и др., 1985). Продукт слияния ХТП2-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза клонируют в указанную экспрессионную кассету. Введение этой плазмиды в *Agrobacterium* и последующая трансформация растений раскрывается в нижеследующих примерах.

Для специалиста очевидно, что могут быть созданы разнообразные химерные конструкторы, использующие способность конкретного ХТП импортировать соответствующий фермент глифозат-оксидоредуктазу в хлоропласт растительной клетки. Импорт глифозат-оксидоредуктазы в хлоропласт может быть определен с помощью следующего анализа.

Анализ на поглощение хлоропластом Центрифугированием из салата (*Lactuca sativa*, сорт лонгифолия) в градиента Перколь/фиколь выделяют интактные хлоропласты по видоизмененной методике Bartlett и др., (1982). Полученные дебрис интактных хлоропластов суспендируют в 0,5 мл стерильного 330 мМ сорбита в 50 мМ Гепес-КОН (рН 7,7), проверенного на хлорофил (Arnon, 1949), и устанавливают конечную концентрацию хлорофила в 4 мг/мл (использованием сорбита/Гепеса). Выход интактных хлоропластов из одного кочна салата составляет 3-6 мг хлорофила.

В типичном эксперименте на поглощение с 300 мкл используют 5 мМ АТФ, 8,3 мМ немеченного метионина, 322 мМ сорбита, 58,3 мМ Гепес-КОН (рН 8), 50 мкл продукта трансляции лизата ретикулоцитов и интактные хлоропласты из *L. sativa* (200 мкг хлорофила). Полученную смесь осторожно вращают при комнатной температуре (в пробирках из стекла размером 10 x 75 мм) непосредственно перед волоконнооптическим излучателем, настроенным на максимальную интенсивность света (лампа на 150 Вт). Аликвоты образцов смеси (примерно 50 мкл) отбирают в различные промежутки времени и фракционируют в градиентах силиконового масла (в полиэтиленовых пробирках на 150 мкл) центрифугированием 30 с при 11000 X G. В этих условиях интактные хлоропласты образуют под слоем силиконового масла дебрис, а инкубационная среда (содержащая лизат ретикулоцитов) всплывает на поверхность. После центрифугирования градиенты силиконового масла сразу же замораживают в сухом льду. Хлоропластные дебрис затем вновь суспендируют в 50-100 мкл лизисного буфера (10 мМ Гепес-КОН с рН

7,5, 1 мМ PMSF, 1 мМ бензамидина, 5 мМ ϵ аминок-н-капроновой кислоты и 30 мкг/мл апротинина) и центрифугируют 20 мин при 15000 X G для превращения в дебрис тилакоидных мембран. Прозрачную надосадочную жидкость (стромальные белки), полученную центрифугированием, и аликвоту инкубационной среды с лизатом ретикулоцитов от каждого эксперимента на поглощение смешивают с равным объемом 2X НДС-АГЭ образца буфера для электрофореза (см. ниже).

НДС-ПАГЭ проводят по методике Laemmli (1970) в 3-17% (мас./об.) акриламидных пластинках геля (60 мм x 1,5 мм) с 3% (мас./об.) акриламидного концентрирующего геля (5 мм x 1,5 мм). Гель фиксируют 20-30 мин в растворе 40% метанола и 10% уксусной кислоты. Затем гель замачивают 20-30 мин в EN³HANCE^R (ДюПонт) с последующим высушиванием геля в сушилке для гелей. Гель проявляют автордиографией использованием интенсифицирующего экрана и примерно суточной выдержки для определения того, была ли глифозат-оксидоредуктаза импортирована в выделенные хлоропласты.

Альтернативная методика выделения других структуральных генов глифозат-оксидоредуктазы

Ряд других генов глифозат-оксидоредуктазы идентифицирован и клонирован, в том числе второй LBAA ген глифозат-оксидоредуктазы из космиды pMON7477 класса II. Ген расположен (Саузерн-гибридизация) на HindIII фрагменте в ~ 23 к. о., охарактеризованном в вышеприведенном разделе о клонировании, с использованием первого гена глифозат-оксидоредуктазы в качестве зонда. Саузерн-анализ показал также PstI и BglII гибридационные полосы в ~ 3,5 и ~ 2,5 к. о. соответственно. BglII фрагмент из pMON7477 субклонируют в BamHI сайт pBlue Script вектора. Клон в E.coli JM101 (pMON7482), в котором клонированный фрагмент ориентирован относительно lac-промотора так же, как в pMON17469 # 1, индуцируют ИПТГ и анализируют на глифозат-оксидоредуктазную активность. В данном эксперименте достигнута уд. акт. ~93 нмоль/мин•мг. В последующем эксперименте также выделены космиды класса I и класса II после инфицирования E. coli JM101 препаратом упакованной космиды и отбора непосредственно на толерантность к глифозату при концентрации глифозата 3-5 мМ на M9 среде.

Ген глифозат-оксидоредуктазы также был субклонирован из другого микробиального изолята, первоначально идентифицированного по его способности усваивать глифозат в качестве источника фосфора, и для которого позднее показано содержание предполагаемого гена глифозат-оксидоредуктазы при гибридации с LBAA глифозат-оксидоредуктазным генным зондом. Этот вначале был клонирован в T7 промоторную космиду отбором на толерантность к глифозату в E.coli HB101/pGPI-2 (Boyer и Rolland-Dussoix, 1969; Tabor и Richardson, 1985) на M9 среде, содержащей 3 мМ глифозата. На присутствие гена глифозат-оксидоредуктазы вначале указал положительный сигнал гибридации с

LBAA геном, а также его положение на BglII фрагменте в 2,5 к.о. Этот BglII фрагмент был клонирован в BamHI сайт в pBlue Script (pMON17183) и экспрессирован из lac-промотора добавлением ИПТГ. В этом опыте получена глифозат-оксидоредуктаза с удельной активностью 53 нмоль/мин•мг, подтверждая выделение гена при такой стратегии. Следующие признаки обычно обнаруживаются у этих генов глифозат-оксидоредуктазы: гены определяются (Саузерн-гибридизацией применением генных зондов глифозат-оксидоредуктазы полной длины) на BglII фрагментах ~ 2,5 к. о., на PstI фрагментах ~3,5 к.о., содержат один EcoRI сайт в пределах гена и гены не содержат HindIII сайта. Схематичная диаграмма (см. фиг. 13) иллюстрирует некоторые общие признаки этих генов.

Большая схожесть генов глифозат-оксидоредуктазы предполагает кроме того и иной путь, которым могут быть клонированы глифозат-оксидоредуктазы. Кажущаяся консервативность областей, фланкирующих гены, и отсутствие определенных сайтов рестрикции предполагает применение одонитевых олигонуклеотидных зондов к фланкирующим областям, содержащим сайты рестрикции для BglII, HindIII, PstI, BamHI, NdeI или других приемлемых сайтов клонирования ЦРП (цепная реакция полимеразы, все подробности о ЦРП и ее применении см. Erlich, 1989) для амплификации приемлемого для клонирования фрагмента гена глифозат-оксидоредуктазы. Фланкирующие последовательности для 119 п.о. в восходящем направлении (ПОСЛЕД. N 11) гена глифозат-оксидоредуктазы дикого типа (LBAA изолят) и для ~290 п.о. (ПОСЛЕД. N 12) в нисходящем направлении гена представлены на фиг. 2.

С помощью ЦРП подхода выделены гены глифозат-оксидоредуктазы из ряда источников. Наличие глифозат-оксидоредуктазной активности подтверждено клонированием гена глифозат-оксидоредуктазы из хромосомной ДНК, полученной от вида Pseudomonas, штамм LBr (Jacob и др., 1988), и использованием праймеров, гомологичных N- и C-окончаниям LBAA гена глифозат-оксидоредуктазы и содержащих следующие приемлемые рестрикционные сайты клонирования:

5'-GAGAGACTGT CGACTCCGCG GGAGCATCAT ATG-3' (ПОСЛЕД. N 13) и 5'-GAACGAATCC AAGCTTCTCA CGACCGCGTA AGTAC-3'(ПОСЛЕД. N 14)

Для этих ЦРП реакций используют следующие циклотермические параметры:

Денатурирование при 94°C 1 мин;
Гибридизация при 60°C 2 мин;
Полимеризация при 72°C 3 мин
30 циклов без автоусушения, связывание инкубированием при 4°C.

Образован ожидаемый ЦРП продукт в ~1,3 к.о. и после гидролиза в присутствии NdeI и HindIII фрагмент клонирован в pMON2123 для экспрессии кодированного фермента. Глифозат-оксидоредуктазную активность определяют вышеприведенным методом, и K_m для глифозата аналогично

вышеприведенным значениям для ферментов из LBAA.

Источник гена глифозат-оксидоредуктазы K_m (глифозат, мМ) Вид *Pseudomonas*, штамм LBг

Бактерии, выделенные из вспомогательных потоков обработки отходов производства глифозата, также могут оказаться способными превращать глифозат в АМФК. Штаммы *Pseudomonas* LBAA и LBг являются примерами таких бактерий. Такие бактерии могут быть выделены de novo из таких продуктов обработки отходов.

Популяцию бактерий выделяют с колонки с фиксированным слоем иммобилизованных клеток, в которой используются шарики из Маннвиль R-635 диатомовой земли с нанесением на триптоновый соевый агар (Дифко), содержащий 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$ циклогексимида, и инкубированием при 28°C. Колонка работает три месяца на отработанных водах в качестве сырья, поступающих с завода по производству глифозата филиала Монсанто Компани, шт. МС. Колонка содержит 50 мг/мл глифозата и NH_3 в виде NH_4Cl . Общее содержание органического углерода 300 мг/мл и ПБК (Потребность в биологическом кислороде - мера доступности "мягкого" углерода) менее 30 мг/мл. Такая колонка для обработки описана в работе Heitkamp и др. (1990). Одним из преобладающих членов этой популяции, идентифицированным, как штамм T10 вида *Agrobacterium*, растет так же, как обнаружено, в минимальном бульоне, в котором единственным источником углерода является глифозат в концентрации 10 мМ (такой бульон готовят так же, как DF среду, но с заменой глюкозы, глюконата и цитрата глифозатом). Из этого изолята получают хромосомную ДНК и подвергают той же ЦРП процедуре и с теми же праймерами, что и описанные выше для штамма LBг. Образован фрагмент нужного размера, который клонируют в *E.coli* экспрессионный вектор. Проводят анализ на глифозат-оксидоредуктазную активность и кроме того определяют K для глифозата:

Источник гена - К (глифозат, мМ)

Вид *Agrobacterium*, штамм T10 - 28

Превращение глифозата в АМФК установлено для многих различных почв (обзор см. : Malik и др., 1989), и существует ряд методик извлечения общей ДНК из смешанных образцов окружающей среды, например, почвы (Holben. и др., 1988; Steffan и Atlas 1988; Tsai и Olson, 1991), что указывает на возможность клонирования генов глифозат-оксидоредуктазы без необходимости получать вначале изолят, такой как разрушенные микроорганизмы. Разумеется, методика, раскрытая для клонирования генов глифозат-оксидоредуктазы и основанная на придании *E. coli* способности усваивать глифозат или толерантности к глифозату, предлагает схему, по которой могут быть клонированы другие гены глифозат-оксидоредуктазы и другие гены метаболизма глифозата, не полагаясь на гомологию, определенную для гена глифозат-оксидоредуктазы, раскрытого здесь. Возможно также обогащение разрушающими глифозат бактериями, например, неоднократным внесением глифозата в

участок почвы (Quinn и др., 1988; Talbot и др., 1984). Такая стадия обогащения может быть использована для большей простоты выделения из почвы или иных образцов окружающей среды генов глифозат-оксидоредуктазы.

Свидетельства присутствия гена глифозат-оксидоредуктазы в почвенных бактериях и методика выделения таких генов представлены ниже. Популяцию соответствующих бактерий обогащают с целью селекции бактерий, способных расти в жидкой среде с глифозатом (10 мМ) в качестве источника углерода (такую среду готовят по методике приготовления среды Дворкина-Фостера, но с исключением источников углерода и использованием Р в качестве источника Р). Инокулум создают экстрагированием почвы (с полей в Джерсейвилле с недавно убранной соей, Иллинойс) и отбором популяции последовательным культивированием при 28°C в вышеописанной среде (для предотвращения роста грибов добавлено 100 мкг/мл циклогексимида). При нанесении на пластинки с L-агаром в качестве среды идентифицированы колонии 5 типов. Хромосомную ДНК получают из 2 мл культуры этих изолятов в 1-бульоне и присутствие гена глифозат-оксидоредуктазы зондируют с помощью ЦРП отбора. Использованием праймеров:

GCCGAGATGACCGTGCCGAAAGC

(ПОСЛЕД. N 15) и GGGAATGCCGCATGCTTCAACGGC (ПОСЛЕД. N 16) получен фрагмент ДНК предсказанного размера с хромосомной ДНК от одного из изолятов (обозначен, как 3). Условия ЦРП следующие: 1 мин при 94°C; 2 мин при 40°C; 3 мин при 72°C, 35 циклов. ДНК фрагмент, полученный таким путем, применяют в качестве зонда (после радиомечения) для выделения 3 кандидата в гены глифозат-оксидоредуктазы из космидного банка, сконструированного так, как описано для LBAA ДНК, что сильно ускоряет выделение других генов глифозат-оксидоредуктазы. Применяемые праймеры гомологичны внутренним последовательностям в LBAA гене глифозат-оксидоредуктазы. Используемые условия ЦРП допускают значительную степень несоответствия между праймерами, а полученный результат предполагает, что ген глифозат-оксидоредуктазы из 3 может и не быть и не столь близок к другим генам глифозат-оксидоредуктазы, последовательно выделенным с помощью праймеров к N- и С-окончанию LBAA гена.

Существуют самые различные методики выделения генов. Некоторые из этих методик основаны на знании назначения гена, что позволяет создавать фенотипные средства отбора, помогающие выделению. Другие методики основаны на информации о по меньшей мере части ДНК последовательности, что позволяет применять зонды или праймеры с частичной или полной гомологией, или же методики основаны на применении антител, с помощью которых обнаруживают генный продукт. Все эти возможности могут быть применены для клонирования генов глифозат-оксидоредуктазы.

Улучшение кинетических свойств

глифозат-оксидоредуктазы

Прежние примеры создания гербицидной устойчивости ферментативной дезактивацией гербицида основывались на применении ферментов со способностью связывать и подвергать метаболизму гербициды с гораздо большей эффективностью по сравнению с метаболизмом глифозата под действием глифозат-оксидоредуктазы. Фермент глифозат-оксидоредуктаза характеризуется значением K_m к глифозату в 20-30 мМ, поэтому скорость реакции разрушения глифозата может быть доведена до оптимального уровня в трансгенных растениях либо понижением K_m , либо повышением V_{max} .

Технология случайного мутагенеза в сочетании с соответствующей селекцией и/или отбором являются мощным инструментом, успешно используемым для создания большого числа мутагенизированных генных последовательностей и потенциальных вариантов. Этот же подход может быть использован для выделения и идентификации вариантов глифозат-оксидоредуктазы с улучшенной эффективностью в разрушении глифозата. Технология мутагенеза, которая может быть использована, включает химический мутагенез бактериальных культур, содержащих представляющий интерес ген, или очищенной ДНК, содержащей этот ген, а также ЦРП методы, применяемые для создания копий гена (или его частей) в условиях, благоприятствующих ошибочному введению нуклеотидов (ошибок) в новую нить. Например, этому способствует проведение ЦРП в присутствии Mn^{++} .

Приемлемые средства отбора *in vivo* улучшенных в результате мутагенеза вариантов могут заключаться в улучшении толерантности к глифозату в *E.coli* или в возрастании роста на глифозате в Mru^+ штаммах. Для отбора ген глифозат-оксидоредуктазы клонируют в вектор, содержащий слабый бактериальный промотор и/или репликон с небольшим числом копий. Фенотипы толерантности к глифозату, как показано, меняются в интервале концентрация глифозата и коррелируются с уровнем экспрессии глифозат-оксидоредуктазы. Например, в неиндуцируемых условиях векторы P_{lac} -глифозат-оксидоредуктазы экспрессируют меньше глифозат-оксидоредуктазы, чем P_{tac} -глифозат-оксидоредуктазные векторы, а также характеризуются меньшей толерантностью к глифозату. Мутагенизированный генный фрагмент клонируют в наиболее приемлемый вектор и затем отбирают полученную библиотеку. Варианты отбирают по их способности расти при концентрациях глифозата, ингибирующих рост контрольного штамма, содержащего родственный клон глифозат-оксидоредуктазы. Глифозат-оксидоредуктазная активность придает *E.coli* способность превращать глифозат в АМФК, и в приемлемых штаммах *E.coli* эта АМФК может служить источником фосфата после расщепления С-Р-связи С-Р-лиазой. К приемлемым штаммам *E.coli* относятся В штаммы или Mru^+ производные К штаммов. Ген глифозат-оксидоредуктазы придает штамму *E. coli* JM101 Mru^+ (= GB993) минимальный рост на глифозате в качестве

единственного источника фосфора. Показано, что скорость роста на глифозате также коррелируется с уровнем экспрессии глифозат-оксидоредуктазы.

Мутагенизированный ген глифозат-оксидоредуктазы клонируют в приемлемый вектор и библиотеку вариантов отбирают по различным скоростям роста на пластинках или культивированием в среде, содержащей глифозат в качестве единственного источника фосфора. Клоны, показавшие более быстрый рост на пластинках по сравнению с контрольным штаммом, затем повторно отбирают анализом кривой роста.

Варианты глифозат-оксидоредуктазы, идентифицированные при каждой селекции/отборе, клонируют в вектор для экспрессии на высоком уровне и подвергают ферментативному анализу с определением K_m и V_{max} значений для глифозата.

Наилучшие варианты глифозат-оксидоредуктазы очищают для полной кинетической характеристики. Варианты глифозат-оксидоредуктазы, для которых определены более низкие K_m значения и аналогичные или более высокие V_{max} значения по сравнению со значениями для фермента дикого типа, подвергают секвенс-анализу нуклеиновых кислот с определением мутации(-ий). Цель выделения вариантов будет заключаться в повышении k_{cat}/K_m отношения для катализируемого глифозат-оксидоредуктазой разрушения глифозата.

Выделен вариант с подобными улучшениями. Используемая методика мутагенеза заключалась в применении ЦРП с отравлением Mn^{++} , а матрицей служила переведенная в линейную форму генная плаزمид глифозат-оксидоредуктазы, содержащая синтетический ген глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 8). Применяемые олигонуклеотидные праймеры были гомологичны к областям вектора и фланкируют ген глифозат-оксидоредуктазы. Применялись следующие условия ЦРП: 1 мин при 94°C, 2 мин при 55°C, 3 мин при 72°C, 35 циклов. Применяют 5:1 отношение dCTP+dCTP+TTP к dATP. Реакционная смесь содержит $MnCl_2$ в концентрациях 125, 250, 375 или 500 мкМ. После реакции амплифицированный продукт реклонировать в вектор, содержащий слабый *E. coli* промотор. Этим вектором является pBR327 производное, содержащее *araBAD*-промотор и приемлемые сайты клонирования. Сто колоний с этого этапа клонирования затем отбирают в *E.coli* GB993 на улучшенную толерантность к глифозату и фенотипы усвоения в среде, представляющей собой MOPS минимальную среду с глифозатом и Pi или только с глифозатом соответственно. Скорости роста определяют измерением A_{550} в течение 96 ч. Идентифицировано три клона, характеризующихся при таком отборе более быстрыми скоростями роста. Эти трансформанты отличаются в 1,5-2 раза более быстрым фенотипом усвоения. Ген глифозат-оксидоредуктазы реклонировать в часть вектора экспрессии с проверкой этого генотипа. Весь кинетический анализ проведен на сырых *E. coli* лизатах. Предполагаемые

варианты белков глифозат-оксидоредуктазы были сверхэкспрессированы после субклонирования NcoI/HindIII варианта гена глифозат-оксидоредуктазы в PsecA-генIOL вектор экспрессии. Для сверхэкспрессий в PsecA-генIOL конструктах содержащие вектор СВ993 клетки индуцируют при значении Klett = 110-120 в M9 минимальной среде с 50 мкг/мл налидиксиновой кислоты и оставляют расти 2,5 ч при 37°C и интенсивном встряхивании. Клетки собирают центрифугированием 5 мин при 4000G и 4°C и вновь суспендируют в 100 мМ Трис-HCl (pH 7,1), 1 мМ ЭДТК, 35 мМ KCl, 20% глицерина и 1 мМ бензамидина при 3 мл/г дебрис. Лизаты получают разрушением клеток во Французском прессе дважды при 1000 psi (68 атм). Нерастворимые дебрис удаляют центрифугированием 15 мин при 12000G и 4°C, а надосадочную жидкость обессоливают пропусканием через PD-10 колонку (Сефадекс G-25, Фармация). Фракцию свободного объема используют в качестве источника фермента в кинетическом анализе. Концентрации белка определяют с помощью анализа на связывания белка с красителем фирмы БиоРад. Для определения линейных интервалов строят кривые времени и концентрации фермента. Ферментативный анализ проводят следующим образом. Лизат и глифозат-оксидоредуктазную смесь (конечная концентрация = 0,1 М MOPS, 0,01 М трицина с pH 7,4, 0,01 мМ ФАД, 10 мМ MgCl₂) в 100 мкл реакционной среды прединкубируют 2 мин при 30°C перед добавлением глифозата (чистый для анализа образец получен из воды с установленным pH 7 добавлением NaOH). Определено, что оптимальное время ферментативного анализа при использовании 10 мкг лизата - 10 мин. После выдерживания 10 мин при 30°C и встряхивания добавляют 0,25 мл реактива динитрофенилгидразина (ДНФГ; 0,5 мг/мл в 0,5 М HCl) и реакционную смесь оставляют еще на 5 мин при 30°C и встряхивании. Затем к анализируемой смеси добавляют раствор (400 мкл) 1,5 М NaOH и реакцию продолжают 5 мин при 30°C и встряхивании. Ферментативную активность определяют по количеству образовавшегося аддукта глиоксилат-ДНФГ измерением A₅₂₀ относительно стандарта глифозата. Ферментативный анализ осуществляют в дублях на по меньшей мере двух изолятах колоний предполагаемого варианта глифозат-оксидоредуктазы. Для определения K_m и V_{max} ферментативный анализ осуществляют в (0,2-2)хK интервале концентраций глифозата. Значения K_m и V_{max} определяют на основании кривых линейного построения по Burk, Eadie-Hofstee и гиперболических кинетических кривых. Значение V_{max} получают после определения в лизате количества иммунореактивного белка глифозат-оксидоредуктазы с помощью иммуноблот-анализа, описанного ниже. Иммуноблот-анализ проводят после НДС-ПАГЭ и переноса белка с геля на нитроцеллюлозу при 500 мА в аппарате для переноса Hoeffer в 25 мМ Трис-HCl, 192 мМ глицерина, содержащих 0,1% НДС и 25% метанола, в течение 1-2 ч. После переноса нитроцеллюлозу инкубируют при комнатной температуре и встряхивании по меньшей мере 30 мин с 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 0,9% NaCl,

0,01% Твин 20, 0,02% NaN₃, содержащих 2% бычьего сывороточного альбумина. После блокирования добавляют тот же буфер, содержащий в разбавлении 1:25000 козью анти-глифозат-оксидоредуктазную антисыворотку, и фильтр встряхивают 45 мин при комнатной температуре. После инкубирования с первичными глифозат-оксидоредуктазными антителами фильтр промывают 45 мин в буфере без антител, затем добавляют в разбавлении 1:5000 вторые антитела кролика к козьим антителам, связанным с щелочной фосфатазой (от Pierce), и фильтр инкубируют 45 мин при комнатной температуре и встряхивании. Затем фильтр промывают 30 мин в буфере без антител перед добавлением NBT и BCIP (Промега) для появления окрашивания. Иммунореактивный белок глифозат-оксидоредуктазу кроме того определяют количественно дот-блотированием лизата на нитроцеллюлозе с последующей обработкой фильтра вышеприведенным методом за исключением того, что для детектирования применяют ¹²⁵I-белок G. Количество белка глифозат-оксидоредуктазы в лизате определяют подсчетом пятен и сравнением уровня радиоактивности со стандартом белка глифозат-оксидоредуктазой. Один из вариантов (V.247) показал в 3-4 раза более высокую удельную активность для глифозат-оксидоредуктазы при 25 мМ глифозата, и иммуноблот-анализ показал, что это не вызвано повышенным уровнем белка глифозат-оксидоредуктазы. Последующими анализами установлено, что этот вариант обладает в 10 раз более низким значением K_m для глифозата по сравнению с дикого типа глифозат-оксидоредуктазой. Аналогичным путем определено значение K_m для ИДУ, и полученные данные представлены в табл. А.

Ген глифозат-оксидоредуктазы подвергнут секвенс-анализу (ПОСЛЕД. N 17), при этом обнаружено пять изменений в нуклеотидах. Эти изменения указаны ниже в их связи с кодонами: GCT на GCC (кодон 43), без изменения аминокислоты; AGC на GGC (кодон 84), Ser на Gly; AAG на AGG (кодон 153), Lys на Arg; GAC на CGC (кодон 334), His на Arg и CCA на CCG (кодон 362), без изменения аминокислоты. Аминокислотная последовательность гена глифозат-оксидоредуктазы из V.247 представлена ПОСЛЕД. N 18. Важность этих различных изменений аминокислот первоначально определена реклонированием измененных областей в глифозат-оксидоредуктазу дикого типа с последующим выявлением влияния изменений на активность и кинетику глифозат-оксидоредуктазы. Эта операция сопровождалась реклонированием NcoI-NheI фрагмента (содержит кодон 84), NheI-ApaI фрагмента (содержит кодон 153) и ApaI-HindIII фрагмента (содержит кодон 334) по отдельности в ген дикого типа. Эти гены глифозат-оксидоредуктазы затем экспрессируют с последующим проведением кинетического анализа. Полученные данные, представленные в табл. Б, показывают, что только изменения, произошедшие в ApaI-HindIII фрагменте (содержит кодон 334), ответственны за изменение фермента.

Полученные результаты подтверждены и расширены повторением замены His на Arg у кодона 334 и введением других специфичных изменений у этого остатка сайт-направленным мутагенезом.

Ниже перечислены использованные праймеры:

Arg - CGTTCTCTAC ACTCGTGCTC
GTAAGTTGC (ПОСЛЕД. N 19);

Lys - CGTTCTCTAC ACTAAGGCTC
GTAAGTTGC (ПОСЛЕД. N 20);

Gln - CGTTCTCTAC ACTCAAGCTC
GTAAGTTGC (ПОСЛЕД. N 21);

Ala - CGTTCTCTAC ACTGCTGCTC
GTAAGTTGC (ПОСЛЕД. N 22).

(приведенные последовательности противоположны реально использованным последовательностям). Наличие указанных изменений подтверждено проведением секвенс-анализа мутагенизированных генов глифозат-оксидоредуктазы и кинетического анализа ферментов глифозат-оксидоредуктазы.

Полученные данные, представленные в табл. В, показывают, что в этом положении возможен целый ряд замен, которые приводят к ферменту с измененными кинетическими свойствами.

Для замены N 334 остатка другими аминокислотами осуществлен дополнительный мутагенез. Использованные при этом праймеры и новые кодоны перечислены ниже.

Trp -
CTCTACACTTGGGCTCGTAAGCTTCTTCCAGC
(ПОСЛЕД. N 23);

Ile -
CTCTACACTATCGCTCGTAAGCTTCTTCCAGC
(ПОСЛЕД. N 24);

Leu -
CTCTACACTTGGCTCCTAAGCTTCTTCCAGC
(ПОСЛЕД. N 25);

Glu -
CTCTACACTGAAGCTCGTAAGCTTCTTCCAGC
(ПОСЛЕД. N 26)

(приведенные последовательности противоположны реально использованным последовательностям, кроме того эти праймеры добавляют "тихий" HindIII сайт, ускоряющий мутагенизированное потомство данной популяции). GLU 334 вариант сохраняет значительную глифозат-оксидоредуктазную активность, в то время как TRP334, ILE334 и LEU334 варианты сохраняют гораздо меньше активности.

Из вариантов первого поколения те, которые отличаются наиболее высоким K_{cat}/K_m отношением, рекомендуют подвергать второму раунду мутагенеза с последующим отбором и анализом. Альтернативный подход заключается в конструировании второго поколения вариантов глифозат-оксидоредуктазы сочетанием одноточечного мутагенеза, идентифицированного в вариантах первого поколения.

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ

Растения, которым практикой настоящего изобретения может быть придана толерантность к глифозату, включают, но без ограничения только ими: сою, хлопок, кукурузу, брюкву, масличный рапс, лен, сахарную свеклу, подсолнечник, картофель, табак, томаты, пшеницу, рис, люцерну, салат, яблони, тополь и сосну.

Молекула двунитовой ДНК настоящего

изобретения ("химерный ген") может быть введена в геном растения любым приемлемым способом. Приемлемые вектора трансформации растений включают вектора, происходящие из Ti плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, а также вектора, описанные в работах, напр.: Herrera-Estrella (1983), Bevan (1984), Klee (1985) и в ЕРО-публикации 120516 (Schilperoort и др.). Помимо векторов трансформации растений, происходящих из Ti или индуцируемых корнями (Ri) плазмид *Agrobacterium*, в альтернативных методах в клетки растения могут быть введены ДНК конструкторы настоящего изобретения. Подобные могут включать, например: применение липосом, электропорацию, применение химикатов, повышающих поглощение свободной ДНК, выделение свободной ДНК использованием микросфокусированной бомбардировки, а также трансформацию с помощью вирусом или пыльцы.

Вектор трансформации растений pMON979 происходит из pMON886 (описана ниже) при замене гена неомицин-фосфотрансферазы типа II (KAN) в pMON886 фрагментом в 0,89 к. о., содержащим бактериальный ген гентамицин-3-N-ацетил-трансферазы типа III (AAC(3)-III) (Hayford и др., 1988). Химерный P-35S/AA(3)-III/NOS3' ген кодирует устойчивость к гентамицину, что позволяет отбирать трансформированные клетки растения. pMON979 кроме того содержит экспрессионную кассету в 0,95 к.о., состоящую из усиленного CaMV35S-промотора (Kay и др., 1987), нескольких уникальных сайтов рестрикции и NOS3' конец (P-En-CaMV35S/NOS 3'). Остальные сегменты ДНК в pMON979 точно такие же, как в pMON886.

Плазмиду pMON886 конструируют из следующих сегментов ДНК. Первым является фрагмент в 0,93 к. о. от Aval до созданного EcoRV, выделенный из транспозона Tn7, кодирующего бактериальную устойчивость к спектиномицину/стрептомицину (Spс/Str) что является детерминантой для отбора в *E.coli* и *Agrobacterium tumefaciens*. Этот фрагмент соединен с сегментом ДНК в 1,61 к.о., кодирующим химерный ген устойчивости к канамицину, позволяющий отбирать трансформированные клетки растения. Химерный ген (P-35S/KAN/NOS 3') состоит из 35S-промотора мозаичного вируса цветной капусты (CaMV), гена неомицин-фосфотрансферазы типа II (KAN) и 3'-нетрансляционной области гена нопалин-синтетазы (NOS 3') (Fraleу и др., 1983). Следующий сегмент представлен 0,75 к.о. oriV, содержащий источник репликации из RK2 плазмиды. Сегмент присоединен к Sall-PvuI сегменту в 3,1 к.о. плазмиды pBR322 (ori 322), обеспечивающему источник репликации для установления в *E.coli* и botm сайте конъюгационного переноса в клетки *Agrobacterium tumefaciens*. Следующий представлен 0,36 к.о. PvuI-BclI из pTIT37, несущими правую граничную область Т-ДНК нопалинового тина (Fraleу и др., 1985).

Плазмиды pMON981 содержат следующие ДНК сегменты: 0,93 к.о. фрагмента, выделенного из транспозона Tn7, кодирующего бактериальную устойчивость к спектиномицину/стрептомицину /Spс/Str детерминанта для отбора в *E.coli* и

Agrobacterium tumefaciens (Fling и др., 1985); химерный ген устойчивости к канамицину, созданный для экспрессии в растениях с целью отбора трансформированной ткани и состоящей из 0,35 к.о. 35S-промотора мозаичного вируса цветной капусты (P-35S) (Odell и др., 1985), 0,83 к.о. гена неомицин-фосфотрансферазы типа II (KAN) и 0,26 к.о. 3'-нетрансляционной области гена нопалин-синтетазы (NOS 3') (Fraley и др., 1983); 0,75 к.о. источника репликации из RK2 плазмиды (oriV) (Stalker и др., 1981); 3,1 к.о. Sall-PvuII сегмента из pBR322, обеспечивающего источник репликации для установления в E. coli (ori-322) и bom сайте конъюгационного переноса в клетки Agrobacterium tumefaciens, и 0,36 к.о. PvuII-BclI фрагмента из pTIT37, плазмиды, содержащего правую граничную область T-ДНК нопалинового типа (Fraley и др., 1985). Экспрессионная кассета состоит из 0,6 к.о. 35S-промотора из мозаичного вируса норичника (P-FMV) (Cowada и др., 1989) и 0,7 к.о. 3'-нетрансляционной области rbc S-E9 гена гороха (E9 3') (Coruzzi и др., 1984 и Morelli и др., 1985), Sspl фрагмент в 0,6 к.о., содержащий FMV35S-промотор (фиг. 1), создают для внедрения приемлемых сайтов клонирования в нисходящем направлении от сайта начала транскрипции.

Растительный вектор мобилизуют в ABI штамм Agrobacterium tumefaciens. ABI штамм является A208 Agrobacterium tumefaciens, несущей бесплечевую Ti плазмиду pTiC58 (pMP90RK) (Koncz и Schell, 1986). Ti плазида не несет генов T-ДНК фитогормонов, вследствие чего штамм не способен вызывать заболевание корончатый галлом. Скрещивание растительного вектора в ABI проводят в системе трехродственной конъюгации использованием плазмиды-хельпера pRK2013 (Ditta и др., 1980). При инкубировании растительной ткани с конъюгатом ABI: растительный вектор переносится в клетки растения с помощью vir-функций, кодируемых бесплечевой pTiC58 плазмидой. Вектор раскрывается у правой граничной области T-ДНК, и полная последовательность растительного вектора может быть внедрена в хромосому растений-хозяина. Плазида pTiC58 не переносится в клетку растения, а остается в Agrobacterium.

РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ

При достижении в трансформированных клетках (или протопластах) адекватного продуцирования глифозат-оксидоредуктазной активности клетки (или протопласты) регенерируют в целое растение. Выбор методологии этапа регенерации решающей роли не играет, и существуют приемлемые методики для хозяев из Leguminosae (Люцерна, соя, клевер и т.д.), Umbelliferae (морковь, сельдерей, пастернак), Cruciferae (капуста, редис, рапс и т.д.), Cucurbitaceae (дыня и огурец), Gramineae (пшеница, рис, кукуруза и т.д.), Solanaceae (картофель, табак, томаты, перец) и различных цветочных культур. См. напр.: Ammirato, 1984, Shimamoto, 1989; Fromm 1990; Vasil 1990.

Нижеследующие примеры даются для лучшего освещения практики настоящего изобретения и ни в коей мере не должны рассматриваться как ограничивающие объем

настоящего изобретения. Для специалиста очевидно, что в раскрываемые здесь методы и гены могут быть внесены различные модификации, усечения и т. д. без отхода от духа и объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Экспрессия, активность и фенотип глифозат-оксидоредуктазы в трансформированных растениях

В следующих, представленных в виде примеров воплощения изобретения описаны трансформация, экспрессия, активность глифозат-оксидоредуктазы и фенотип толерантности к глифозату, придаваемый растениям генами глифозат-оксидоредуктазы, вводимыми в Nicotiana tabacum, сорт "Самсун" и/или brassica napus, сорт Вестар с помощью векторов pMON17073, pMON17032, pMON17065, pMON17066, pMON17138 и pMON17164. Исходные данные для табака по экспрессии обработанного гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) под контролем En-CaMV35S-промотора (см. данные для pMON17073 в таблицах VIII и IX, например) указывают на очень низкий уровень экспрессии глифозат-оксидоредуктазы. Транскрипция гена подтверждена в случае 3-4 растений Нозерн и S1 анализом, но никакого белка глифозат-оксидоредуктазу обнаружить не удалось (предел обнаружения в данном анализе ~0,01% от уровня экспрессии). Анализ R₀ растений после опрыскивания 0,4 фунт/га (примерно 0,448 кг/га) глифозата также выявил очень низкий уровень толерантности. Модификация генной последовательности (см. выше) привела к улучшению экспрессии в табаке, как и применение FMV-промотора и применение ХТП слияния с геном глифозат-оксидоредуктазы. По этой причине большинство представленных данных относится к трансгенным растениям, полученным с помощью векторов, содержащих эти улучшенные конструкторы глифозат-оксидоредуктазы. Один ряд экспериментов с модифицированным вектором глифозат-оксидоредуктазы (pMON17032) представлен в примере 1, а исследование обработанной глифозат-оксидоредуктазы, синтетической глифозат-оксидоредуктазы и ХТП1-синтетической глифозат-оксидоредуктазы представлено в примере 2. Трансформация и экспрессия глифозат-оксидоредуктазы в каноле раскрываются примером 3.

Пример 1

Методика трансформации на кружках табачных листьев требует здоровых листьев возрастом около 1 месяца. После стерилизации поверхности 15-20 мин 10% Хлорокса плюс поверхностно-активное вещество листья ополаскивают 3 раза стерильной водой. С помощью стерильного бумажного штампа вырезают из листьев кружочки, которые помещают внутренней поверхностью вверх на MS104 среду (MS соли 4,3 г/л, сахароза 30 г/л, В5 витамины 500X 2 мл/л, НУК 0,1 мг/л, БА 1 мг/л) для предкультивирования в течение 1 дня.

Затем кружочки инокулируют примерно суточной культурой бесплечевого штамма Agrobacterium ABI, содержащего целевой вектор, разбавленный в отношении 1/5 (т.е. примерно 0,6 ОП). Инокуляцию проводят помещением кружков в центрифужные

пробирки с культурой. Спустя 30-60 с жидкость сливают и кружки помещают между стерильной фильтровальной бумагой. Затем кружки помещают внутренней поверхностью вверх на питательную среду MS104 вместе с кружками из фильтровальной бумаги для сокультивирования.

После 2-3 дней сокультивирования кружки переносят опять же внутренней поверхностью вверх на селекционные пластинки с MS104 средой. Спустя 2-3 недели образуется каллюс, и с кружков из листьев удаляют отдельные побеги. Побеги чисто отрезают от каллюса, когда они становятся достаточно большими, чтобы отличить их от стебля. Побеги помещают на не содержащую гормонов среду укоренения (MSO: MS соли 4,3 г/л, сахара 30 г/л и B5 витамины 500X 2 мл/л) с селекцией. За 1-2 недели образуются корни. Любой анализ каллюса рекомендуют проводить с укоренившимися побегами и в стерильном состоянии. Укоренившиеся побеги помещают в почву и выдерживают в условиях высокой влажности (напр., в пластиковых контейнерах или мешках). Побеги закалывают постепенным воздействием обычно влажности.

Всего исследовано 45 устойчивых к канамицину рMON17032 табачных линий (таблица V).

Повторное каллюсообразование листьями на культурной среде растительной ткани указывает на низкий уровень толерантности к глифозату (оценена, как +/- фенотип) для по меньшей мере 11 из этих линий. По меньшей мере 24 из этих линий экспрессируют глифозат-оксидоредуктазу на поддающемся обнаружению уровне в интервале 0,5-2 нг на 50 мкг извлекаемого белка. Толерантность к глифозату, проявившаяся в анализе с повторным каллюсообразованием листьями, и более высокий уровень экспрессии глифозат-оксидоредуктазы указывают на то, что изменения, проведенные в кодирующих глифозат-оксидоредуктазу последовательностях для получения модифицированного гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 7), оказывают заметное влияние на способность этого гена экспрессироваться в растениях. Того же эффекта можно также затем добиться экспрессированием обработанного гена глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 6) использованием более сильного растительного промотора, использованием лучших сигнальных последовательностей 3'-полиаденилирования, оптимизацией последовательностей возле кодона инициации для рибосомной загрузки и инициации трансляции или сочетанием этих и других последовательностей или факторов экспрессии или регуляции. R1 потомство ряда этих линий с наиболее высоким уровнем экспрессии глифозат-оксидоредуктазы (NN 18854 и 18848) опрыскивают глифозатом в дозировке (0,4 и 1 фунт/ар (0,448 и 1,12 кг/га соответственно) и в течение четырех недель оценивают вегетативное поведение (таблица VI).

После начального промежутка времени и особенно для растений, экспрессирующих глифозат-оксидоредуктазу на самом высоком уровне, указанные линии растений показали вегетативную толерантность к глифозату (которая улучшалась со временем).

Глифозат-оксидоредуктазная ферментативная активность определена для двух рMON17032 линий (NN 18858 и 18881). Собирают ткань листьев (1 г), замораживают в жидком N₂ и хранят при -80 °C перед экстрагированием. Для экстрагирования ткань листьев размельчают в ступке с пестиком и жидким N₂. К размельченной в порошок ткани листьев затем добавляют 1 мл экстракционного буфера (100 мМ Трис Cl с рН 7,4, 1 мМ ЭДТК, 20% глицерина, 35 мМ KCl, 1 мМ бензамидин •HCl, 5 мМ аскорбата Na, 5 мМ дитиотреитола и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 4°C) и образец растирают еще 1 мин. Полученную смесь 5 мин центрифугируют (высокоскоростная центрифуга Эппендорфа) и обработкой надосадочной жидкости насыщенным раствором сульфата аммония достигают 70%-ного конечного насыщения (2,33 мл насыщенного раствора/мл экстракта). Осадившийся белок отделяют центрифугированием в вышеуказанной центрифуге и дебрис вновь суспендируют в 0,4 мл экстракционного буфера. После повторного центрифугирования для удаления веществ в виде частиц образец обессоливают на Сефадексе G50, загруженном в шприц на 1 мл и уравновешанном экстракционным буфером по методике Penefsky (1976). Обессоленные растительные экстракты хранят на льду и концентрацию белка определяют методом Bradford (1976). Реакции глифозат-оксидоредуктазы проводят в дублях 60 мин при 30°C в смеси для анализа, состоящей из 0,1 MOPS/0,01 трицинового буфера (рН 7,4), содержащих 10 мМ MgCl₂, 0,01 мМ флавинадениндинулеотида (ФАД, Сигма) и 1 мМ убихинона Q_o (Сигма). Растительные экстракты (75 мкл) прединкубируют 2 мин в смеси для анализа и реакцию иницируют добавлением в качестве субстрата иминодиуксусной кислоты (ИДУ, 20 мкл) до конечной концентрации 50 мМ (полный объем анализируемой смеси 0,2 мл). Реакционную смесь нейтрализуют и дериватизируют (см. ниже). Кроме того, проведены контрольные реакции без ИДУ и без растительного экстракта. Детектирование глиоксилата осуществляют применением 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) для дериватизации и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенными фазами по модифицированной методике Qureshi и др. (1982). Реакционную смесь глифозат-оксидоредуктазы (0,2 мл) нейтрализуют 0,25 мл реактива ДНФГ (0,5 мг/мл ДНФГ /Олдрич/ в 0,5 М HCl) и оставляют на 5 мин при 25°C для дериватизации. Затем образцы экстрагируют этилацетатом (2x0,3 мл) и объединенные этилацетатные экстракты экстрагируют 10% Na₂CO₃ (0,3 мл). Фазу Na₂CO₃ промывают один раз этилацетатом (0,2 мл) и инъецируют (100 мкл) в Бекман Ультрасфер C18 IP ВЭЖХ колонку (5 мкм, 4,6 мм x 25 см) использованием ЛКБ GT1 бинарной ВЭЖХ системы с Вотерс 990 УФ/ВИЗ ВЭЖХ детектором фотодиодной конструкции и Вотерс WISP ВЭЖХ автоприсосывателем. Изократной подвижной фазой служит смесь метанол-вода-уксусная кислота (60: 38,5: 1,5) с 5 мМ тетрабутиламмонийфосфата (Пирс). ДНФГ-глиоксилатный пик (время

удерживания = 6,7 мин) детектируется при 365 нм и сравнивается со стандартом гликосилата (Сигма, 20 мкМ в 0,2 мл), дериватизированным таким же образом (табл. VII).

Пример 2

С помощью "изогенных" векторов глифозат-оксидоредуктазы рMON17073 (обработанная глифозат-оксидоредуктаза) (ПОСЛЕД. N 6), рMON17065 (синтетическая глифозат-оксидоредуктаза) (ПОСЛЕД. N 8) и рMON17066 (ХТП1-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза) создан ряд трансформированных линий табака. Вестерн-анализом (см. таблицу VIII) для некоторых из таких линий обнаружено, что растения с обработанной глифозат-оксидоредуктазой экспрессируют вплоть до ~0,5 нг глифозат-оксидоредуктазы на 50 мкг растительного белка, растения с синтетической глифозат-оксидоредуктазой - на уровне ~0,5-2 нг на 50 мкг и растения с ХТП1-синтетической глифозат-оксидоредуктазой - на уровне ~2-20 нг на 50 мкг.

Ряд первичных трансформантов R₀ линий, экспрессирующих обработанную или синтетическую глифозат-оксидоредуктазу, или ХТП1-синтетическую глифозат-оксидоредуктазу опрыскивают глифозатом в дозировке 0,4 фунт/ар (0,448 кг/га) и оценивают по прежней шкале (см. табл. IX).

Линия синтетической глифозат-оксидоредуктазы характеризуется реакцией, аналогичной той, которая отмечена для R₁ растений с модифицированной глифозат-оксидоредуктазой, т. е. немедленным действием глифозата, исчезающим со временем в результате метаболизма гербицида под действием глифозат-оксидоредуктазы до производных: АМФК и гликосилата. Поскольку мишень для глифозата (ЕПШФ-синтаза) расположена в хлоропласте, активность глифозат-оксидоредуктазы должна снижать уровень глифозата в этой органелле удалением гербицида прежде, чем тот достигнет хлоропласта. Растения с ХТП1-синтетической глифозат-оксидоредуктазой характеризуются более высокой толерантностью к глифозату, проявляющейся в том, что на эти растения глифозат не оказывает сильного, если вообще оказывает, немедленного воздействия при указанной дозировке. В целом, обработанные толерантные растения также отличаются нормальным развитием, цветением и плодоношением.

Растения с ХТП1-синтетической глифозат-оксидоредуктазой характеризуются заметно более высоким уровнем экспрессии глифозат-оксидоредуктазы по сравнению с другими конструктами глифозат-оксидоредуктазы. Повышенный уровень глифозат-оксидоредуктазы может быть связан с усиленной трансляцией продукта спlicing или с секвестированием глифозат-оксидоредуктазы в хлоропласте, что увеличивает период полураспада белка. Более высокий уровень глифозат-оксидоредуктазы и/или ее расположение в хлоропласте может привести к более высокому уровню толерантности за счет быстрой детоксификации глифозата в хлоропласте. Присутствие глифозат-оксидоредуктазы в хлоропласте

подтверждено. Пять листьев от каждого из четырех растений (NN 22844, 22854, 22886, 22887), для которых доказана Вестерн-положительность, гомогенизируют в смесителе Варинга в 0,9 л GR+буфер (Bartlet и др., 1982) в течение 3 x 3 с при высокой скорости. Гомогенизат фильтруют через 4 слоя Мираклоз и центрифугируют при 6000 об./мин в GS-3 роторе. Дебрис вновь суспендируют в GR+буфере (всего 4 мл) и помещают в верхнюю часть 40/80% ступенчатого градиента Перколя и вращают 10 мин при 9500 об./мин. Интактные хлоропласты (нижняя полоса) промывают один раз GR-буфером (Bartlet и др., 1982) и центрифугируют (вплоть до 6000 об./мин без торможения). Дебрис снова суспендируют в 300 мкл 50 мМ Гепес (pH 7,7), 330 мМ сорбита и лизируют на льду с помощью ультразвука (небольшая проба, 30%-3 отстоя в микронаконечнике x 10 с). Дебрис осаждают в надосадочную жидкость пропускают через колонку с Сефадексом G50 в 50 мМ Гепеса (pH 7,5). Концентрация растворимого белка 2,4 нг/мл. Анализ фермента проводят вышеописанными методами с применением в качестве субстратов 50 мМ ИДУ и 50 мМ глифозата (30 мин на анализ), но без добавления 1 мМ убихинона (табл. IX').

Пример 3

Ряд трансформированных линий брюквы создают с векторами рMON17138 (ХТП1-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза) и рMON17164 (ХТП2-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза) следующим образом.

Растительный материал

Рассаду Brassica napus, сорт Вистар высаживают в 2-х-дюймовые (~5 см) горшочки, содержащие Метро Микс 350. Рассаду выращивают в ростовой камере при 24°C, фотопериоде 16/8 ч, интенсивности света 400 уЕм⁻² с⁻¹ (HID лампы). Удобрят удобрением марки Питерс 20-10-20 Специальное, общего назначения. Через 2,5 недели рассаду пересаживают в 6-дюймовые (~15 см) горшки и выращивают в ростовой камере при температуре 15/10°C (день/ночь), фотопериоде 16/8 ч, интенсивности света 800 уЕм⁻² с⁻¹ HID лампы. Удобрят удобрениями марки Питерс 15-30-15 Специальное Хай-Фос.

Трансформация/селекция/регенерация

Четыре концевых междоузлий от растений непосредственно перед стрелкованием или в процессе стрелкования, но перед цветением удаляют и стерилизуют с поверхности в 70%-ном (об./об.) этаноле в течение 1 мин, 2%-ном (мас./об.) гипохлорите натрия в течение 20 мин и ополаскивают 3 раза стерильной деионизированной водой. Стебли с листьями могут быть охлаждены в увлажненных пластиковых мешках в течение до 72 ч перед стерилизацией. Шесть-семь сегментов стебля нарезают на кружочки в 5 мм с помощью Редко растительного резака 200 с установлением ориентации базального конца.

Agrobacterium выращивают примерно сутки в ротаторе при 24°C в 2 мл бульона Луриа, содержащего 50 мг/л канамицина, 24 мг/л хлорамфеникола и 100 мг/л спектиномицина. Готовят 1:10 разбавление в MS (Murashige и Skoog) среде, что дает примерно

9•10⁸ клеток на мл. Это подтверждено показателем оптической плотности при 660 nm. Кружки стебля (экспланты) инокулируют 1 мл Agrobacterium, избыток с эксплантов отсасывают.

Экспланты помещают базальной стороной вниз на пластинки Петри, содержащие 1/10X стандартных MS солей, B5 витамины, 3% сахарозы, 0,8% агара (pH 5,7), 1 мг/л 6-бензиладенина (БА). На пластинки наносят слой 1,5 мл среды, содержащей MS соли, B5 витамины, 3% сахарозы (pH 5,7), 4 мг/л п-хлорфеноксиуксусной кислоты, 0,005 мг/л кинетина и покрывают стерильной фильтровальной бумагой.

После 2-3 дней сокультивирования экспланты переносят в глубокие плоские чашки Петри, содержащие MS соли, B5 витамины, 3% сахарозы, 0,8% агара (pH 5,7), 1 мг/л БА, 500 мг/л карбенициллина, 50 мг/л цефотаксима, 200 мг/л канамицина или 175 мг/л гентамицина для селекции. На каждую пластинку помещают семь эксплантов. Спустя 3 недели экспланты переносят в свежую среду по 5 эксплантов на пластинку. Экспланты культивируют в ростовой комнате при 25°C и непрерывном освещении (холодный белый свет).

Анализ экспрессии

Через 3 недели с эксплантов срезают побеги. Для подтверждения модификации R₀ побегов проводят анализ на повторное каллюсообразование в листьях. Три крохотных кусочка ткани листьев помещают на среду повторного каллюсообразования, содержащую MS соли, B5 витамины, 3% сахарозы, 0,8% агара (pH 5,7), 0,5 мг/л нафталинуксусной кислоты (НУК), 500 мг/мл карбенициллина, 50 мг/л цефотоксима и 200 мг/л канамицина или гентамицина, или глифозата. Анализируемые листья инкубируют в ростовой комнате в тех же условиях, что культура эксплантов. Спустя 3 недели проводят оценку анализа на повторное каллюсообразование с позиций толерантности к гербициду (каллус или ткань зеленого листа) или чувствительности (отбеливание).

Трансплантация

В момент обрезки стебли побегов погружают в Рутон^R и помещают в 2-х дюймовые (~ 5 см) горшочки, содержащие Метро-Микс 350, и горшочки помещают в замкнутое увлажненное окружение. Затем горшочки помещают в ростовую камеру при 24 °С, фотопериоде 16/8 ч, 480 уЕм⁻¹ с⁻² (HID лампы на 3 недели периода закаливания).

Семена, собранные с R₀ растений, являются R₁ семенами, из которых выращивают R₁ растения. Для выявления толерантности R₀ растения к глифозату исследуют его потомство. Поскольку считается, что R₀ растение гемизиготно у каждого местоположения вставки, "свое" приводит к максимуму генотипной сегрегации в R₁. Поскольку каждая вставка действует, как доминантный аллель, в отсутствие связи, и приняв, что только одна гемизиготная вставка необходима для экспрессии толерантности, одна вставка будет сегрегировать в отношении 3:1, две вставки - 15:1, три вставки - 63:1 и т/д. Поэтому необходимо вырастить сравнительно мало растений для обнаружения по меньшей мере

одного фенотипа устойчивости.

Семена R₀ растения собирают, обмолачивают и сушат перед высаживанием в испытании на опрыскивание глифозатом. Применяют самые различные технологии для выращивания R₁ растений для последующего испытания с опрыскиванием. Испытания проводят как в теплицах, так и в ростовых камерах. Применяют две системы высаживания: горшочки ~10 см или подносы для высаживания с 32 или 36 ячейками. Применяемой для высаживания почвой служит либо Метро 350 плюс три типа удобрений постепенного действия, либо Метро 350 для рассады. Поливка либо поверхностная в теплицах, либо применяют субиригацию в ростовых камерах. Удобрения вносят вместе с водой для поливки. Поддерживают приемлемый для бьюквы температурный режим. Устанавливают фотопериод в 16 ч. В начале цветения растения пересаживают в горшочки ~15 см для образования семян.

Опрыскиваемая "партия" состоит из нескольких групп R₁ потомства, которые опрыскивают в один и тот же день. Некоторые партии могут кроме того включать потомство отличных от R₁ растений. Каждая партия включает опрысканные и неопрысканные нетрансгенные генотипы, представляющие в конкретной партии генотипы, которые предположительно были трансформированы. Кроме того в партию включают один или несколько несегрегированных трансформированных генотипов, для которых ранее выявлена некоторая устойчивость.

Двадцать шесть растений от каждого отдельного R₀ потомства не опрыскивают и используют в качестве контроля для сравнения и оценки толерантности к глифозату, а также для оценки любых отклонений, не связанных с глифозатом. Когда другие растения достигают стадии 2-4 листьев (обычно 10-20 дней после посева), наносят глифозат в дозировке 0,28-1,12 кг/га в зависимости от целей исследования. Лабораторный трековый опрыскиватель калибруют для поступления дозировки, эквивалентной полевым условиям.

Для оценки вегетативной устойчивости опрысканных растений применяют шкалу в 0-10 баллов. Шкала соотнесена с неопрысканными растениями того же R₀ семейства. 0 означает гибель растения, а 10 означает отсутствие видимых отличий от неопрысканного растения. Более высокое число в интервале 0-10 представляет прогрессивно меньшие повреждения по сравнению с неопрысканным растением. Оценку растений проводят на 7, 14 и 28 день после обработки (ДПО) или до стрелкования, и линии дается средняя оценка для опрысканных растений в пределах R₀ растительного семейства.

Используют шесть цифровых показателей для качественной оценки степени репродуктивного урона от глифозата:

- 0 - отсутствие развития цветочных почек,
- 2 - цветочные почки присутствуют, но опадают до раскрытия,
- 4 - цветки раскрываются, но пыльники отсутствуют или пыльники не способны экструдировать за лепестки,
- 6 - стерильные пыльники,
- 8 - частично стерильные пыльники,

10 - полностью плодоносные цветы.
 Растения оценивают с помощью этой шкалы в момент или сразу же после начала цветения в зависимости от скорости развития цветочных структур.

В нижеследующих таблицах X и XI сведены вегетативные и репродуктивные оценки растений брюквы, трансформированных рMON17138 (опрыскивание в дозировке 0,56 кг/га) и рMON17164 (опрыскивание в дозировке 0,84 кг/га) соответственно. Нижепредставленные результаты иллюстрируют толерантность к глифозату, придаваемые растениям брюквы в результате экспрессии в растениях гена глифозат-оксидоредуктазы.

Пример 4

Ген глифозат-оксидоредуктазы кроме того введен и экспрессирован в сое с приданием этому растению толерантности к глифозату. Ген слияния ХТП2-синтетическая глифозат-оксидоредуктаза (см. выше) вводят в сою под контролем FMV-промотора и с NOS3'-последовательностями в рMON17159, карта которой представлена на фиг. 10. Этот вектор состоит из следующих элементов помимо генных последовательностей глифозат-оксидоредуктазы: рUC - источник репликации, NPT11 - бактериальный ген селекционного маркера (канамициния) и гена бета-глюкоронидазы (GUS : Jefferson, и др., 1986) под контролем E35S-промотора с E9 3'-последовательностями. С последним геном дается поддающийся оценке маркер, облегчающий идентификацию трансформированного растительного материала.

Растения сои трансформируют рMON17159 методом микрофокусированной инъекции при использовании технологии с впрыскивателем частиц по методике Christou и др. (1988). Семена, собранные с R₀ растений, являются R₁ семенами, из которых вырастают R₁ растения. Для выявления толерантности R₀ растений к глифозату исследуют потомство этого растения. Поскольку предполагается, что R₀ растение гемизиготно у каждого местоположения вставки, "свое" приводит к максимуму генотипной сегрегации в R₁. Поскольку каждая вставка действует в отсутствие связи, как доминантный аллель, и полагая, что для экспрессирования толерантности необходима только одна гемизиготная вставка, которая будет сегрегировать в отношении 3:1, две вставки - 15:1, три вставки - 63:1 и т.д. Таким образом, для выявления по меньшей мере одного фенотипа устойчивости необходимо вырастить сравнительно небольшое число R₁ растений.

Семена R₀ растения сои собирают и сушат перед высевом для испытаний с опрыскиванием глифозатом. Семена высевают в 4-х дюймовые (~5 см) квадратные горшочки, содержащие Метро 350. Двадцати ростков от каждого R₀ растения считают достаточными для испытания. Растения выдерживают и выращивают в тепличных условиях. Устанавливают фотопериод в 12,5-14 ч и температуру 30°C днем и 24°C ночью. По мере необходимости вносят водорастворимые удобрения марки Питерс Пит Лайт.

"Партия" для опрыскивания состоит из нескольких групп R₁ потомства, которые все опрыскивают в один и тот же день. Некоторые партии могут также включать потомство отличных от R₁ растений. Каждая партия кроме того включает опрысканные и неопрысканные нетрансгенные генотипы, представляющие в конкретной партии генотипы, предположительно трансформированные. В партию включены также один или несколько несегрегированных генотипов, для которых ранее выявлена некоторая устойчивость.

Одно-два растения из каждого отдельного R₀ потомства не опрыскивают и используют в качестве контроля для сравнения и оценки толерантности к глифозату, а также для оценки любых отклонений, не связанных с глифозатом. Когда другие растения достигают первой стадии трех листьев (обычно 2-3 недели после посева), глифозат наносят в дозировке, эквивалентной 128 унций/ар (8,895 кг/га) Раундап[®]. Лабораторный трековый опрыскиватель калибруют для опрыскивания в дозировке, эквивалентной указанным условиям.

Применяют вегетативную шкалу оценок в 0-10 баллов. Оценка соотносится с неопрысканным потомством того же R₀ растения. 0 означает гибель растения. 10 означает отсутствие видимой разницы с неопрысканным растением. Более высокое числовое значение в интервале 0-10 представляет прогрессивно меньшее повреждение по сравнению с неопрысканным растением. Оценку растений проводят на 7, 14 и 28 день после обработки (ДПО) (см. табл. XII).

Пример 5

Ген глифозат-оксидоредуктазы кроме того введен в клетки черной мексиканской сладкой (ЧМС) кукурузы с экспрессией белка, обнаруживаемого в каллюсе.

Для введения гена глифозат-оксидоредуктазы в клетки кукурузы применяют плазмиду рMON19632. Скелет такой плазмиды конструируют вставкой 0,6 к.о. 35S-РНК-промотора (E35S) мозаичного вируса цветной капусты (CaMV), содержащего удвоение области от -90 до -300 (Кау и др., 1987), 0,58 к.о. оснований фрагмента, содержащего первый интрон гена спиртовой гидрогеназы кукурузы (Callis и др., 1987) и 3'-терминационные области из гена нопалин-синтетазы (NOS) (Fraley и др., 1983) в рUC119 (Yanisch-Perron и др., 1985). рMON19632 образуют вставкой 1,7 к.о. BglIII/EcoRI фрагмента из рNON17064, содержащего Arabidopsis SSU ХТП, слитый с кодирующей последовательностью синтетической глифозат-оксидоредуктазы (ПОСЛЕД. N 8).

Плазмиду рMON19632 вводят в клетки ЧМС кукурузы совместной бомбардировкой с ЕС9 - плазмидой, содержащей сульфонилмочевинуустойчивую форму гена ацетолактат-синтетазы кукурузы. Каждой плазмидой (2,5 мкг) покрывают поверхность частиц вольфрама и вводят с помощью PDS - 1000 инжектора в ЧМС клетки в log-фазе, по существу, по методике Klein и др. (1989). Трансформанты отбирают на М среде, содержащей 20 ч/блн хлорсульфуруна. После первоначальной селекции на сульфурон

каллюсы анализируют вестерн-блотированием глифозат-оксидоредуктазы.

Каллюс ЧМС (3 г влажной массы) сушат на фильтровальной бумаге (Ватман N 1) под вакуумом, перевешивают, после чего добавляют экстракционный буфер (500 мкл/г сухой массы; 100 мМ Трис, 1 мМ ЭДТК, 10% глицерина). Ткань гомогенизируют с помощью подвесной мешалки Вийтона в течение 30 с с интервалами в 2,8 с. После центрифугирования (3 мин, микроцентрифуга Эппендорфа) надосадочную жидкость удаляют и белок определяют количественно (анализ белка набором БиоРад). Образцы (50 мкг/ячейку) наносят на НДС-ПАГЭ гель (Jule 3-17%) вместе со стандартом глифозат-оксидоредуктазы (10 нг), подвергают электрофорезу и переносят на нитроцеллюлозу аналогично ранее описанному методу (Padgett 1987). Нитроцеллюлозный блот зондируют козким анти-глифозат-оксидоредуктазным ИгС и проявляют ¹²⁵I-белком G. Радиоактивный блот делают видимым с помощью автордиографии. Результаты получают количественно денситометрией на ЛКБ УльтраСкан XI лазерном денситометре (см. таблицу XIII).

Данные таблицы XIII показывают, что глифозат-оксидоредуктаза может экспрессироваться и детектироваться в однодольных растениях, таких как кукуруза.

Пример 6

Ген глифозат-оксидоредуктазы может быть использован в качестве селекционного маркера трансформации растений непосредственно на среде, содержащий глифозат. Способность отбирать и идентифицировать трансформированный растительный материал зависит в большинстве случаев от применения доминантного селекционного маркерного гена, способствующего ткани в присутствии обычно ингибирующего вещества. Гены устойчивости к антибиотику и толерантности к гербициду использовались почти исключительно в качестве таких доминантных селекционных маркерных генов в присутствии соответствующего антибиотика или гербицида. Схема селекции nptIII/канамицин, вероятно, используется наиболее часто. Показано, что глифозат-оксидоредуктаза также применима и, возможно, с большим успехом в схеме селекционный маркер/селекция для продуцирования и идентификации трансформированных растений.

Вектором трансформации растений, который может быть использован в такой схеме, является рMON17226 (фиг. 11). Данная плаزمидна сходна со многими другими уже описанными плазмидами и, по- существу, состоит из ранее раскрытой бактериальной репликационной системы, позволяющей этой плазмиде реплицироваться в *E.coli*, а также быть введенной и реплицироваться в *Agrobacterium*, бактериального селекционного маркерного гена (*Spc/Str*), а между правой границей T-ДНК и левой границей расположен синтетический ген глифозат-оксидоредуктазы в FMS-промотор-E9 3'-кассете. Данная плазмидна обладает также единственными сайтами для ряда ферментов рестрикции, расположенными в пределах границ и вне экспрессионной кассеты. Это делает возможным легко добавлять другие гены и

генетические элементы к вектору для введения в растения.

Методика прямой селекции трансформированных растений на глифозате приведена для табака. Экспланты готовят для предкультивирования по стандартной методике, приведенной в примере 1. Поверхность листьев растения табака в возрасте 1 месяца стерилизуют (15 минут в 10%-ном хлороксе + поверхностно-активное вещество; промывка 3X дН₂O); экспланты нарезают квадратиками размером 0,5 x 0,5 см с удалением краев листьев, средней жилки листа, кончика и черешка для получения однородного тканевого типа; экспланты помещают внутренней поверхностью вверх одним слоем на MS104 пластинки + 2 мл 4C005K среда для увлажнения поверхности; предкультивируют 1-2 дня. Экспланты инокулируют с помощью примерно суточной культурой *Agrobacterium*, содержащей плазмиду трансформации растений, в которой устанавливают титр 1,2 • 10⁹ бактерий/мл с 4C005K средой. Экспланты помещают в центрифужную пробирку, добавляют суспензию *Agrobacterium* и смесь бактерий и эксплантов интенсивно вращают 25 секунд при максимальных оборотах с гарантированием равномерного проникновения бактерий. Бактерии сливают, а экспланты помещают между слоями сухой стерильной фильтровальной бумаги для удаления избытка бактерий. Высушенные экспланты помещают внутренней поверхностью вверх на MS104 пластинки + 2 мл 4C005K среды + кружок фильтра. Сокультивируют 2-3 дня. Экспланты переносят на MS104 + 1000 мг/л карбенициллина + 100 мг/л цефотаксима на 3 дня (фаза выдерживания). Затем экспланты переносят M104 + 0,05 мМ глифозата + 1000 мг/л карбенициллина + 100 мг/л цефотаксима для фазы селекции. В течение 3-5 дней образуются корни и в этот момент кусочки листа могут быть отобраны из укоренившихся пластинок для подтверждения толерантности к глифозату и того, что материал трансформирован.

Присутствие белка глифозат-оксидоредуктаза в этих трансформированных тканях подтверждено иммуноблот-анализом кружков из листьев. Ниже представлены данные одного из экспериментов с рMON17226. Побег (25 штук), образовавшиеся на глифозате из 100 эксплантов, инокулируют *Agrobacterium ABI/* рMON17226; 15 из них оказались положительными на повторное каллюсообразование на глифозате и 19 из них оказались положительными для белка глифозат-оксидоредуктазы при детектировании иммуноблотированием. Полученные данные указывают на степень трансформации 15-19 на 100 эксплантов, что характеризует такую процедуру трансформации растений, как высокоэффективную и времясберегающую. Аналогичная частотность трансформации достигнута и с производным рMON17226 (рMON17241), содержащим ген для глифозат-оксидоредуктазы V. 247 (ПОСЛЕД. N 17). Показано, что ген глифозат-оксидоредуктазы позволяет также проводить прямую селекцию трансформантов в других видах растений, в том числе: *Arabidopsis*, картофеле и сахарной свекле.

Из вышеизложенного можно видеть, что настоящее изобретение отвечает поставленным целям и обладает преимуществами, которые очевидны и неотделимы от изобретения.

Необходимо указать, что определенные признаки и подкомбинации могут быть использованы без ссылок на другие признаки и подкомбинации. Это определяется и охватывается объемом формулы изобретения.

Поскольку возможно осуществление многих воплощений изобретения без отхода от его объема, необходимо указать, что весь изложенный материал или показанный в диаграммах следует рассматривать, как иллюстративный, но не как ограничительный.

Список литературы

Ammirato, P. V. , et al. Handbook of Plant Cell Culture - Crop Species. Macmillan Publ. Co. (1984).

Avila, L.Z., Loo, S.H. and Frost, J.W. (1987) Chemical and mutagenic analysis of aminomethylphosphonate biodegradation. J. Amer. Chem. Soc. 109: 6758-6764.

Balthazor, T.M. and Hallas, L.E. (1986) Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 51:432-434.

Bartlett, S. G. , Grossman, A.R., and Chua, N.H. (1982) in Methods in Chloroplast Molecular Biology, pp. 1081-1091. M. Edelman, R.B., Hallick, and Chua, N.H., eds.

Bevan, M. (1984) Nucleic Acids Res 12 (22):8711-8721.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7:1513-1525.

Boyer, H.W. and Rolland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41:459.

Bradford, M. Anal. Biochem. 72, 248 (1976).

Callis, J. , Fromm, M. , and Walbot, V. (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. Genes and Dev. 1:1183-1200.

Christou, P. , D.E. McCabe, and W.F. Swain (1988) Stable transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. Plant Physiol. 87:671-674.

Cook, A.M., Daughton, C.G. and Alexander, M. (1978) Phosphonate utilization by bacteria. J. Bacteriol. 133:85-90.

Coruzzi, G. , Broglie, R., Edwards, C., and Chua, N.H. (1984). Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. EMBO J 3, 1671-1679.

Coupland, D. (1985) Metabolism of glyphosate in plants, in The Herbicide Glyphosate. eds. E. Grossbard and D. Atkinson. Butterworths. pp. 25-34.

Daughton, C. G., Cook, A.M. and Alexander, M. (1979a) Bacterial conversion of alkylphosphonates to natural products via carbon-phosphorus bond cleavage. J. Agric. Food Chem. 27: 1375-1382.

Daughton, C. G., Cook, A.M. and Alexander, M. (1979b) Biodegradation of phosphonate toxicants yields methane or ethane on cleavage of the C-P bond. FEMS Microbiol. Lett. 5:91-93.

Daughton, C.G., Cook, A.M. and Alexander, M. (1979c) Phosphate and soil binding: factors limiting bacterial degradation of ionic phosphorous-containing pesticide metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 37:605-609.

della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Taylor, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T. and Kishore G. K. (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-6877.

della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Taylor, M.T., Rochester, D.E., Klein, B. K. , Shah, D.M., Fraley, R.T. and Kishore G.M. (1987) Targeting a herbicide-resistant enzyme from Escherichia coli to chloroplasts of higher plants. Bio/Technology 5:579-584.

Ditta, G. , Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-Negative bacteria: construction of a gene bank of Rhizobium meliloti. Proc Natl Acad Sci USA 77, 7347-7351.

Erlich, H.A. (1989) Ed. PCR Technology - Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York.

Fling, M. E., Kopf, J., and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research 13 no.19, 7095-7106.

Fraley, R. T. , Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G. R. , Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Fraley, R. T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz D.A., Flick, J.S., Fink, C. L. , Hoffmann, N.L. and Sanders, P.R. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation.

Franz, J. E. (1985) Discovery, development and chemistry of glyphosate, in The Herbicide Glyphosate. eds. E. Grossbard and D. Atkinson. Butterworths. pp. 3-17.

Fromm, M. , (1990) UCLA Symposium on Molecular Strategies for Crop Improvement, April 16-22, 1990. Keystone, CO.

Gowda, S., Wu, F.C., and Shepard, R.J. (1989). Identification of promoter sequences for the major RNA transcripts of figwort mosaic and peanut chlorotic streak viruses (caulimovirus group). Journal of Cellular Biochemistry supplement 13D, 301. (Abstract).

Hallas, L. E., Hahn, E.M. and Korndorfer, C. (1988) Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. J. Industrial Microbiol. 3:377-385.

Hayford, M.B., Medford, J.I., Hoffmann, N.L., Rogers, S.G. and Klee, H. J. (1988) Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases. Plant Physiol. 86:1216-1222.

Heitkamp, M.A., Hallas, L. and Adams, W.J. (1990) Biotreatment of industrial wastewater with immobilized microorganisms - Presented in Session 11, Paper S40, Society for Industrial Microbiology Annual Meeting, Orlando, Florida, July 29 - August 3, 1990.

Herrera-Estrella, L. , et al. (1983)

Nature 303:209 Horsch, R.B. and H. Klee. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:4428-32.

Holben, W. E. , Jansson, J.K., Chelm, B.K. and Teidje, J.M. (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. 54:703-711.

Hohn, B. and Collins J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11:291-298.

Jacob, G. S. , Schaefer, J., Stejskal, E.O. and McKay, R.A. (1985) Solid-state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseudomonas* sp. J. Biol. Chem. 260:5899-5905.

Jacob, G. S. , Garbow, J., Hallas, L.E., Kishore, G.M. and Schaefer, J. (1988) Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. Appl. Environ. Microbiol. 54:2953-2958.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanaugh, M.W. Bevan (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal vol. 6, N 13. pp 3901-3907.

Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987) Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236:1299-1302.

Kishore, G. M. and Jacob G.S. (1987) Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2928 via a sarcosine intermediate. J. Biol. Chem. 262:12164-12168.

Klee, H.J., et al. (1985) Bio/Technology 3:637-42.

Klee, H. J., Muskopf, Y.M. and Gasser, C.S. (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate tolerant plants. Mol. Gen. Genet. 210:437-442.

Klein, T.M., Kornstein, L., Sanford, J.C., and Fromm, M.E. (1989) Genetic transformation of maize cells by particle bombardment Plant Phys. 91: 440-444.

Koncz, C. and Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet 204:383-396.

Lerbs, W. , Stock, M. and Parthier, B. (1990) Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp. strain GL. Arch. Microbiol. (1990) 153:146-150.

Liu, C. -M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C. and Cannon, F.C. (1991) Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. Appl. Environ. Microbiol. 57:1799-1804.

Maier, L. (1983) Phosphorus Sulfur 14:295.

Malik, J. , Barry, G. and Kishore, G. (1989) The herbicide glyphosate. BioFactors 2:17-25.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Marshall, G. , Kirkwood, R.C. and Martin, D.J. (1987) Pestic. Sci. 18: 65-77.

Mastalerz, P., Wieczorek, Z. and Kochman, M (1965) Utilization of carbon-bound phosphorus by microorganisms. Acta Biochim. Pol. 12:151-156.

Miller, J.H. (1972). Experiments in

Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Moore, J.K., Braymer, H.D. and Larson, A.D. (1983) Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. 46:316-320.

Morelli, G. , Nagy, F. , Fraley, R.T., Rogers, S.G., and Chua, N.H. (1985). A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. Nature 315, 200-204.

Neidhardt, F. C. , Bloch, P.L. and Smith, D.F. (1974) Culture media for enterobacteria. J. Bacteriol. 119: 736-747.

Nomura, N. S. and Hilton, H.W. (1977) The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. Weed Res. 17:113-121.

Odell, J. T. , Nagy, F., and Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313, 810-812.

Padgett, S., et al. (1987) Bacterial Expression and Isolation of *Petunia hybrida* EPSP Synthase. Arch. Biochem. Biophys. 258:564-573.

Penefsky, H.S., Meth. Enzymol. 56, 527-530 (1979).

Pipke, R., Schulz, A. and Amrhein, N. (1987b) Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. Appl. Environ. Microbiol. 53: 974-978.

Pipke, R. and Amrhein, N. (1988) Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1293-1296.

Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S. and Kishore, G.M. (1987a) Metabolism of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. GLP-1. Eur. J. Biochem. 165:267.273.

Quinn, J.P., Peden, J.M.M. and Dick, E. (1988) Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 511-516.

Quinn, J. P. , Peden, J.M.M. and Dick, R.E. (1989) Appl. Microbiol. and Biotechnology 31:283-287.

Qureshi, A.A., Elson, C.E., and Lebeck, L.A., J. Chromatog. 249,333-345 (1982).

Rueppel, M. L. , Brightwell, B.B., Schaefer, J. and Marvel, J.T. (1977) Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food Chem. 25: 517-528.

Schowaneck, D. and Verstraete, W. (1990) Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 56: 895-903.

Shah, D. , Horsch, R. , Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Tumer, N., Hironaka, C. , Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegal, N., Rogers, S., and Fraley, R. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science 233,478-481.

Shimamoto, K. et al. (1989) Nature 338:274-276.

Shinabarger, D. L. and Braymer, H.D. (1986) Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. J. Bacteriol. 168: 702-707.

Stalker, D. M., Thomas, C.M., and Helinski, D.R. (1981). Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Mol Gen

Genet 181:8-12.

Steffan, R. J. and Atlas, R.M. (1988) DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2185-2191.

Tabor, S. and Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1074-1078.

Talbot, H.W., Johnson, L.M. and Munnecke, D.M. (1984) Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. *Current Microbiol.* 10: 255-260.

Tanaka, J., Kuwano, E. and Eto, M. (1986) Synthesis and pesticidal activities of phosphonate analogs of amino acids. *J. Fac.Agr. Kyushu Univ.* 30: 209-223.

Timko, M. P., Herdies, L., de Alameida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. and Krebbers, E. (1988) Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* in *The Impact of Chemistry on Biotechnology - A Multidisciplinary Discussion*. ACS Books, Washington DC pp. 279-295.

Torstensson, L. (1985) Behavior of glyphosate in soils and its degradation, in *The Herbicide Glyphosate*. eds. E. Grossbard and D. Atkinson. Butterworths. pp. 137-150.

Tsai, Y.-L. and Olson, B.H. (1991) Rapid method for direct isolation of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1070-1074.

Vasil, V., F. Redway and I. Vasil. (1990) *Bio/Technology* 8:429-434.

Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods. Enzymol.* 153: 3.

Wackett, L.P., Shames, S.L., Venditti, C.P. and Walsh, C.T. (1987a) Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* 169:710-717.

Wackett, L. P. , Wanner, B.L., Venditti, C.P. and Walsh, C.T. (1987b) Involvement of the phosphate regulon and the *psiD* locus in the carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169: 1753-1756.

Weidhase, R. , Albrecht, B., Stock, M., and Weidhase, R.A. (1990) Utilization of glyphosate by *Pseudomonas* sp. *GS. Zentralbl. Mikrobiol.* 145:6.

Wong, E.Y., Seetharam, R., Kotts, C.E., Heeren, R.A., Klein, B.K., Bradford, S.R., Mathis, K.J., Bishop, B.F., Siegel, N.R., Smith, C.E. and Tacon, W.C. (1988) Expression of excreted insulin-like growth factor-1 in *Escherichia coli*. *Gene* 68: 193-203.

Yanisch-Perron, C., Vierra, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Zeleznick, L.D., Meyers, T.C. and Titchener, E.B. (1963) Growth of *Escherichia coli* on methyl - and ethylphosphonic acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 78: 546-547.

Формула изобретения:

1. Молекула выделенной двунитевой ДНК, включающая ДНК, кодирующую фермент глифозат оксидоредуктазу, причем

аминокислотная последовательность указанного фермента выбирается из группы, включающей SeqID 5, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 аргинином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 лизином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 глутамином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 аланином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 триптофаном, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 лейцином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 изолейцином, SeqID 5 с заменой гистидинового остатка в положении 333 глутаминовой кислотой и SeqID 18.

2. Молекула рекомбинантной двунитевой ДНК, состоящая из последовательностей: а) промотора, действие которого в растениях вызывает продуцирование РНК последовательности, в) структурной ДНК последовательности, представленной молекулой по п.1, вызывающей продуцирование РНК последовательности, кодирующей фермент глифозат оксидоредуктазу, и с) 3'-нетранслируемой области, действие которой в растениях вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК последовательности, причем промотор гетерологичен по отношению к структурной ДНК последовательности и способен вызывать достаточную экспрессию указанного фермента в растительной ткани, в том числе в меристематической ткани, с усилением толерантности растительной клетки, трансформированной таким геном, к глифозату.

3. Молекула ДНК по п.2, отличающаяся тем, что структурная ДНК последовательность кодирует слитый полипептид, состоящий из аминоконцевого хлоропластного транзитного пептида и фермента глифозат оксидоредуктазы.

4. Молекула ДНК по п.3, отличающаяся тем, что промотор представлен растительным ДНК вирусным промотором.

5. Молекула ДНК по п.4, отличающаяся тем, что промотор выбирают из группы, включающей CaMV 35S и FMV 35S.

6. Способ получения генетически трансформированных растений с толерантностью к гербициду глифозату, отличающийся тем, что осуществляют следующие стадии: а) внедрения в геном растительной клетки молекулы рекомбинантной двунитевой ДНК, состоящей из: I) промотора, действие которого в растительных клетках вызывает продуцирование РНК последовательности, II) структурной ДНК последовательности, вызывающей продуцирование РНК последовательности, кодирующей фермент глифозат оксидоредуктазу, III) 3'-нетранслируемой ДНК последовательности, действие которой в растительных клетках вызывает присоединение полиаденилированных нуклеотидов к 3'-концу РНК последовательности, причем промотор гетерологичен относительно структурной ДНК последовательности и способен вызывать достаточную экспрессию указанного фермента в растительной ткани, в том числе в меристематической ткани, с усилением

толерантности растительной клетки, трансформированной таким геном, к глифозату, в) получения трансформированной растительной клетки и с) регенерирования из трансформированной растительной клетки генетически трансформированного растения с повышенной толерантностью к гербициду глифозату.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что структурная ДНК последовательность

кодирует слитый полипептид, состоящий из аминоконцевого хлоропластного транзитного пептида и фермента глифозат оксидоредуктазы.

5 8. Способ по п.7, отличающийся тем, что промотор происходит от растительного ДНК вируса.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что промотор выбирают из группы, включающей CaMV 35S и FMV 35S промоторы.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 1 6 8 5 4 4 C 2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- (I) Общая информация:
- (I) Заявитель: Kishore Ganesh M. Barry Gerard F.
- (II) Название изобретения: Устойчивые к глифозату растения
- (III) Число последовательностей: 33
- (IV) Адрес для корреспонденции:
- (A) Адресат: Thomas P. McBride Мосанто Ко. ВВ4Г
- (B) Улица: 700 Честерфилд Вилидж Парквэй
- (C) Город: Сан-Луи
- () Штат: Миссури
- (E) Страна: США
- (Г) Индекс: 63198
- (V) Компьютерная считываемая форма:
- (A) Тип среды: Флоппи диск
- (B) Компьютер: ИБМ РС-совместимый
- (C) Оперативная система: PC-DOS/M-DOS
- () Программа: Патент ин рилиз № 1, Вариант № 1.25
- (VI) Текущие сведения по заявке:
- (A) Номер заявки:
- (B) Дата подачи:
- (C) Классификация:
- (VIII) Информация по адвокату/агенту:
- (A) Имя: McBride Thomas P.
- (B) Регистрационный номер: 32706
- (C) Ссылка/номер депонента: 38-21 (10533)

- (IX) Телекоммуникационная информация:
- (A) Телефон: (314)537-7357
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 1:
- (I) Характеристики последовательности:
- (A) Длина: 564 пары оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Число нитей: две
- () Топология: линейная
- (II) (Молекулярный тип: ДНК (геномная)
- (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. №1:

АТТТАГСАГС АТТССАГАТТ GGGТТСААТС ААСААГГТАС GAGCCАТАТС АСТТТАТТСА	60
ААТТGGTATC GCCААААССА АГААГГГААСТ СССАТССТСА ААГГТТТГТА АГГААГААТТ	120
СТСАГТССАА АГССТСААСА АГГТСАГГГТ АСАГАГТСТС САААССАТТА GCCААААГСТ	180
АСАГГАГАТС ААТГААГААТ СТТСААТСАА АГТАААСТАС ТГТТССАГСА САТГСАТСАТ	240
GGTCAГТААГ ТТТСАГАААА АГАСАТССАС СГААГАСТТА ААГТТАГТГГ GCATCTTTGA	300
ААГТААТСТТ GTCAACATCG АГСАГСТГГС ТТГТГГГГГАС САГАСААААА АГГААТГГТГ	360
САГААТТГТТ АГГСГСАСТТ АССААААГСА ТСТТТГССТТ ТАТТГСАААА ГАТАААГСАГ	420
АТТССТСТАГ ТАСААГТГГГ ГААСААААТА АСГТГГАААА GAGCTGTCTT GACAGCCCAС	480
ТСАСТААТГС GТАТГАСГАА СССАГТГАСГ АССАСААААГ ААТТТТСССТ СТАТАТААГА	540
АГГСАТТТСА ТТССАТТТГ ААГС	564

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 2:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 27 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (геномная)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 2:
 АТСАТСАГАТ АСТААССААТ АТТТСТС
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 3:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 1689 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (геномная)
 (IX) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 3:

NCATGGACGT CTGATCGAAA TCGTCGTTAC CGCAGCAAGG TAAGGCACGC CGAATTTTAT	60
CACCTACCGC GAAACGGTGG CTAGGCACGC AGAGACTGTC GGCTCCGCGG GAGCATCCTA	120
TGTCTGAGAA CCACAAAAAA GTAGGCATCG CTGGAGCCGG AATCGTCGGC GTATGCACGG	180

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

CCTGATGCT TCAGCGCCGC GGATTCAAAG TCACCTTQAT TGACCGGAAAC CCTCCTGGCG 240
 AAGGTGCATC GTTTGGGAAT GCGGGATGCT TCAAOGGCTC ATCGGTGCTC CCTATGTCCA 300
 TCCCGGGAAA CTTGACGAGC GTGCCGAANT GCGTCCTTGA CCCGATGCGC CGTTGTCAAT 360
 CCGGTTGAGC TATTTCCAAC CATCATGCGT GTTTGATTGG CTTTCTGTTA GCCGGAAAC 420
 CAACAAGGT GAAGGAGCAO GCGAANGCAC TCCCAATCT CATCAAGTCC ACCGTGCTC 480
 TGATCAAGTC ATTGGCGGAG GAGGCTGATG CGAGCCATCT GATCGGCCAT GAAGGTGATC 540
 TGACCGTATA TCCTGGAGAA GCAGACTTCG CCAAGGACCG CGGAGGTTGG GAACCTGCGC 600
 GTCTCAACCG TGTTCGCACG CAGATGCTCA GCGCGGATGC GTTCCGGGAT TTCGATCCGA 660
 ACTTGTCCCA TCGGTTTACC AAGGGCATTG TTATAGAAOA GAACGGTCAC ACGATTAATC 720
 CGCAAGGGCT CGTGACCCTC TTGTTTCGGC GTTTTATGCG GAACGGTGGC GAATTCGTAT 780
 CTGCGCGTGT CATCGGCTTT GAGACTGAAO GTAGGGCGCT TAAAAGCATT ACAACCAOJA 840
 ACGGCGTTCT GCGCGTTQAT GCAGCGGTTG TCGCAGCGGG CGCACACTCG AATCACTTG 900
 CTAATTCGCT AGGCUATGAC ATCCCGCTCG ATACCGAACG TGGATATCAT ATGCTCATCG 960
 CGAATCCGA ACGCCCTCCA CGCATTCGA CGACCGATGC GTCAGGAAAA TTCATGGCGA 1020
 CACCTATGGA AATGGGGCTT CGCGTGGCGG GTACGGTTGA GTTCGCTGGG CTCACAGCGG 1080
 CTCTAACTG GAALCGTGCG CATGTCTCT ATACCGACGC TCGAAAATT CTTCAGCCC 1140
 TCGCGCTGC GAGTTCTGAA GAACGATATT CCAATGQAT GGGGTTCCGG CCGAGCATCC 1200
 CGGATTCGCT CCCCGTQATT GCGCGGQCAA CCGGGACACC GAGCGTAATC TATGCTTTCG 1260
 GCCATGCTCA TCTCGGCATG ACAGGGGGCG CGATGACCGC AACGCTCGTC TCAGAGCTCC 1320
 TCGCAGGCGA AAGGACCTCA ATCGACATT CGCCCTTGGC ACCAAACCGC TTTGGTATG 1380
 GCAATCCAA GCMAACGGGT CCGGCAAGTT AAGTACTTAC GCGGTCTGA GTACAGCCCA 1440
 GAGCGGGTGT CAAQATCAAT CTGCACCTCG CAATCACCTC GAGGACCCGA AATGCGCCAA 1500
 ATAGAACCA TATTAAOAG TCACGCCCCG AAGCCTTTGG GTCACTACAG TCAGGCGGGC 1560
 CGAGCGGGTG GATTCATTCA TGTTCCGGT CAGCTTCOGA TCAAACCAGA AGGCCAGTCC 1620
 GAGCAATCTG ACGATCTCGT CGATAACCAG GCCAGTCTCG TTCTCGGAA TTTGCTGGC 1680
 GTACTCGAG 1689

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 4:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 1293 пар оснований
 (B) Тип; нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (геномная)
 (IX) Признаки:
 (A) Название/ключ: CDS
 (B) Местоположение: 1..1293
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 4:

385		390		395		400	
CTC GCA GGC GAA AAG ACC TCA ATC GAC ATT TCG CCC TTC GCA CCA AAC							1248
Leu Ala Gly Glu Lys Thr Ser Ile Asp Ile Ser Pro Phe Ala Pro Asn							
		405		410		415	
CGC TTT GGT ATT GGC AAA TCC AAG CAA ACG GGT CCG GCA AGT TAA							1293
Arg Phe Gly Ile Gly Lys Ser Lys Gln Thr Gly Pro Ala Ser							
		420		425		430	

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

ATG TCT GAG AAC CAC AAA AAA GTA GGC ATC GCT GGA GCC GGA ATC GTC	48
Met Ser Glu Asn His Lys Lys Val Gly Ile Ala Gly Ala Gly Ile Val	
1 5 10 15	
GGC GTA TGC ACG GCG CTG ATG CTT CAG CGC CGC GGA TTC AAA GTC ACC	96
Gly Val Cys Thr Ala Leu Met Leu Gln Arg Arg Gly Phe Lys Val Thr	
20 25 30	
TTG ATT GAC CCG AAC CCT CCT GGC GAA GGT GCA TCG TTT GGG AAT GCC	144
Leu Ile Asp Pro Asn Pro Pro Gly Glu Gly Ala Ser Phe Gly Asn Ala	
35 40 45	
GGA TGC TTC AAC GGC TCA TCC GTC GTC CCT ATG TCC ATG CCG GGA AAC	192
Gly Cys Phe Asn Gly Ser Ser Val Val Pro Met Ser Met Pro Gly Asn	
50 55 60	
TTG ACG AGC GTG CCG AAG TGG CTC CTT GAC CCG ATG GGC CGT TGT CAA	240
Leu Thr Ser Val Pro Lys Trp Leu Leu Asp Pro Met Gly Arg Cys Gln	
65 70 75 80	
TCC GGT TCA GCT ATT TCC AAC CAT CAT GCC TGG TTG ATT CGC TTT CTG	288
Ser Gly Ser Ala Ile Ser Asn His His Ala Trp Leu Ile Arg Phe Leu	
85 90 95	
TTA GCC GGA AGA CCA AAC AAG GTG AAG GAG CAG GCG AAA GCA CTC CGC	336
Leu Ala Gly Arg Pro Asn Lys Val Lys Glu Gln Ala Lys Ala Leu Arg	

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

100	105	110	
AAT CTC ATC AAG TCC ACG GTG CCT CTG ATC AAG TCA TTG GCG GAG GAG			384
Asn Leu Ile Lys Ser Thr Val Pro Leu Ile Lys Ser Leu Ala Glu Glu			
115	120	125	
GCT GAT GCG AGC CAT CTG ATC CGC CAT GAA GGT CAT CTG ACC GTA TAT			432
Ala Asp Ala Ser His Leu Ile Arg His Glu Gly His Leu Thr Val Tyr			
130	135	140	
CGT GGA GAA GCA GAC TTC GCC AAG GAC CGC GGA GGT TGG GAA CTG CGG			480
Arg Gly Glu Ala Asp Phe Ala Lys Asp Arg Gly Gly Trp Glu Leu Arg			
145	150	155	160
CGT CTC AAC GGT GTT CGC ACG CAG ATC CTC AGC GCC GAT GCG TTG CGG			528
Arg Leu Asn Gly Val Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ala Asp Ala Leu Arg			
165	170	175	
GAT TTC GAT CCG AAC TTG TCG CAT GCG TTT ACC AAG GGC ATT CTT ATA			576
Asp Phe Asp Pro Asn Leu Ser His Ala Phe Thr Lys Gly Ile Leu Ile			
180	185	190	
GAA GAG AAC GGT CAC ACG ATT AAT CCG CAA GGG CTC GTG ACC CTC TTG			624
Glu Glu Asn Gly His Thr Ile Asn Pro Gln Gly Leu Val Thr Leu Leu			
195	200	205	
TTT CGG CGT TTT ATC GCG AAC GGT GGC GAA TTC GTA TCT GCG CGT GTC			672
Phe Arg Arg Phe Ile Ala Asn Gly Gly Glu Phe Val Ser Ala Arg Val			
210	215	220	
ATC GGC TTT GAG ACT GAA GGT AGG GCG CTT AAA GGC ATT ACA ACC ACG			720
Ile Gly Phe Glu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Lys Gly Ile Thr Thr Thr			
225	230	235	240
AAC GGC GTT CTG GCC GTT GAT GCA GCG GTT GTC GCA GCC GGC GCA CAC			768
Asn Gly Val Leu Ala Val Asp Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Ala His			

RU 2168544 C2

	245	250	255	
TCG AAA TCA CTT GCT AAT TCG CTA GGC GAT GAC ATC CCG CTC GAT ACC				816
Ser Lys Ser Leu Ala Asn Ser Leu Gly Asp Asp Ile Pro Leu Asp Thr				
	260	265	270	
GAA CGT GGA TAT CAT ATC GTC ATC GCG AAT CCG GAA GCC GCT CCA CGC				864
Glu Arg Gly Tyr His Ile Val Ile Ala Asn Pro Glu Ala Ala Pro Arg				
	275	280	285	
ATT CCG ACG ACC GAT GCG TCA GGA AAA TTC ATC GCG ACA CCT ATG GAA				912
Ile Pro Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Phe Ile Ala Thr Pro Met Glu				
	290	295	300	
ATG GGG CTT CGC GTG GCG GGT ACG GTT GAG TTC GCT GGG CTC ACA GCC				960
Met Gly Leu Arg Val Ala Gly Thr Val Glu Phe Ala Gly Leu Thr Ala				
	305	310	315	320
GCT CCT AAC TGG AAA CGT GCG CAT GTG CTC TAT ACG CAC GCT CGA AAA				1008
Ala Pro Asn Trp Lys Arg Ala His Val Leu Tyr Thr His Ala Arg Lys				
	325	330	335	
CTT CTT CCA GCC CTC GCG CCT GCG AGT TCT GAA GAA CGA TAT TCC AAA				1056
Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ser Ser Glu Glu Arg Tyr Ser Lys				
	340	345	350	
TGG ATG GGG TTC CGG CCG AGC ATC CCG GAT TCG CTC CCC GTG ATT GGC				1104
Trp Met Gly Phe Arg Pro Ser Ile Pro Asp Ser Leu Pro Val Ile Gly				
	355	360	365	
CGG GCA ACC CGG ACA CCC GAC GTA ATC TAT GCT TTC GGC CAT GGT CAT				1152
Arg Ala Thr Arg Thr Pro Asp Val Ile Tyr Ala Phe Gly His Gly His				
	370	375	380	
CTC GGC ATG ACA GGG GCG CCG ATG ACC GCA ACG CTC GTC TCA GAG CTC				1200
Leu Gly Met Thr Gly Ala Pro Met Thr Ala Thr Leu Val Ser Glu Leu				

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 5:
- (I) Характеристики последовательности:
- (A) Длина: 430 аминокислот
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная
- (II) Молекулярный тип: белок
- (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 5:

```

Met Ser Glu Asn His Lys Lys Val Gly Ile Ala Gly Ala Gly Ile Val
  1           5           10           15

Gly Val Cys Thr Ala Leu Met Leu Gln Arg Arg Gly Phe Lys Val Thr
           20           25           30

Leu Ile Asp Pro Asn Pro Pro Gly Glu Gly Ala Ser Phe Gly Asn Ala
           35           40           45

Gly Cys Phe Asn Gly Ser Ser Val Val Pro Met Ser Met Pro Gly Asn
           50           55           60

Leu Thr Ser Val Pro Lys Trp Leu Leu Asp Pro Met Gly Arg Cys Gln
           65           70           75           80

Ser Gly Ser Ala Ile Ser Asn His His Ala Trp Leu Ile Arg Phe Leu
           85           90           95

```

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

Leu Ala Gly Arg Pro Asn Lys Val Lys Glu Gln Ala Lys Ala Leu Arg
 100 105 110

Asn Leu Ile Lys Ser Thr Val Pro Leu Ile Lys Ser Leu Ala Glu Glu
 115 120 125

Ala Asp Ala Ser His Leu Ile Arg His Glu Gly His Leu Thr Val Tyr
 130 135 140

Arg Gly Glu Ala Asp Phe Ala Lys Asp Arg Gly Gly Trp Glu Leu Arg
 145 150 155 160

Arg Leu Asn Gly Val Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ala Asp Ala Leu Arg
 165 170 175

Asp Phe Asp Pro Asn Leu Ser His Ala Phe Thr Lys Gly Ile Leu Ile
 180 185 190

Glu Glu Asn Gly His Thr Ile Asn Pro Gln Gly Leu Val Thr Leu Leu
 195 200 205

Phe Arg Arg Phe Ile Ala Asn Gly Gly Glu Phe Val Ser Ala Arg Val
 210 215 220

Ile Gly Phe Glu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Lys Gly Ile Thr Thr Thr
 225 230 235 240

Asn Gly Val Leu Ala Val Asp Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Ala His
 245 250 255

Ser Lys Ser Leu Ala Asn Ser Leu Gly Asp Asp Ile Pro Leu Asp Thr
 260 265 270

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

Glu Arg Gly Tyr His Ile Val Ile Ala Asn Pro Glu Ala Ala Pro Arg
 275 280 285
 Ile Pro Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Phe Ile Ala Thr Pro Met Glu
 290 295 300
 Met Gly Leu Arg Val Ala Gly Thr Val Glu Phe Ala Gly Leu Thr Ala
 305 310 315 320
 Ala Pro Asn Trp Lys Arg Ala His Val Leu Tyr Thr His Ala Arg Lys
 325 330 335
 Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ser Ser Glu Glu Arg Tyr Ser Lys
 340 345 350
 Trp Met Gly Phe Arg Pro Ser Ile Pro Asp Ser Leu Pro Val Ile Gly
 355 360 365
 Arg Ala Thr Arg Thr Pro Asp Val Ile Tyr Ala Phe Gly His Gly His
 370 375 380
 Leu Gly Met Thr Gly Ala Pro Met Thr Ala Thr Leu Val Ser Glu Leu
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Glu Lys Thr Ser Ile Asp Ile Ser Pro Phe Ala Pro Asn
 405 410 415
 Arg Phe Gly Ile Gly Lys Ser Lys Gln Thr Gly Pro Ala Ser
 420 425 430

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 6:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 1296 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (рекомбинантная)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 6:

ATGGCTGAGA ACCACAAAA AGTAGGCATC GCTGGAGCCG GAATCGTCGG CGTATGCACG	60
GCGCTGATGC TTCAGCGCCG CGGATTCAAA GTCACCTTGA TTGACCCGAA CCCTCCTGGC	120
GAAGGTGCAT CGTTTGGGAA TGCCGGATGC TTCAACGGCT CATCCGTCCG CCCTATGTCC	180
ATGCCGGGAA ACTTGACGAG CGTGCCGAAG TGGCTCCTTG ACCCGATGGG GCCGTTGTCA	240
ATCCGGTTCA GCTATTTTCC AACCATCATG CCCTGGTTGA TTCGCTTTCT GTTAGCCGGA	300
AGACCAACA AGGTGAAGGA GCAGGCGAAA GCACTCCGCA ATCTCATCAA GTCCACGGTG	360
CCTCTGATCA AGTCATTGGC GGAGGAGGCT GATGCGAGCC ATCTGATCCG CCATGAAGGT	420
CATCTGACCG TATATCGTGG AGAAGCAGAC TTCGCCAAGG ACCGCGGAGG TTGGGAACTG	480
CGGCGTCTCA ACGGTGTTCC CACGCAGATC CTCAGCGCCG ATGCGTTGGG GGATTTCGAT	540
CCGAACTTGT CGCATGCGTT TACCAAGGGC ATTCTTATAG AAGAGAACGG TCACACGATT	600
AATCCGCAAG GGCTCGTGAC CCTCTGTGTT CGGCGTTTTA TCGCGAACGG TGGCGAATTT	660
GATCTGCCC GTGTATCCG CTTTGAGACT GAAGGTAGGG CGCTTAAAGG CATTACAACC	720
ACGAACGGCG TTCTGGCCGT TGATGCAGCG GTTGTGCGAG CCGGCGCACA CTCGAAATCA	780
C TTGCTAATT CGCTAGGCGA TGACATCCCG CTCGATACCG AACGTGGATA TCATATCGIC	840
ATCGCGAATC CGGAAGCCGC TCCACGCATT CCGACGACCG ATGCGTCAGG AAAATTCATC	900
GCGACACCTA TGGAAATGGG GCTTCGCGTG GCGGGTACGG TTGAGTTCCG TGGGCTCACA	960
GCCGCTCCTA ACTGGAAACG TCGGCATGTG CTCTATACGC ACGCTCGAAA ACTTCTTCCA	1020
GCCCTCGCGC CTGCGAGTTC TGAAGAACGA TATTCCAAAT GGATGGGGTT CCGGCCGAGC	1080
ATCCCGGATT CGCTCCCCGT GATTGGCCGG GCAACCCGGA CACCCGACGT AATCTATGCT	1140
TTCGGCCACG GTCATCTCGG CATGACAGGG GCGCCGATGA CCGCAACGCT CGTCTCAGAG	1200
CTCCTCGCAG GCGAAAAGAC CTCAAATCGAC ATTTGCGCCCT TCGCACCAA CCGCTTTGGT	1260
ATTGGCAAAAT CCAAGCAAAC GGGTCCGGCA AGTTAA	1296

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 1 6 8 5 4 4 C 2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 7:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 1296 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (рекомбинантная)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 7:

CTCCTCGCAG GCGAAAAGAC CTC AATCGAC ATTTCGCCCT TCGCACCAAA CCGCTTTGGT	1260
ATTGGCAAAT CCAAGCAAAC GGGTCCGGCA AGTTAA	1296
ATGGCTGAGA ACCACAAAA AGTAGGCATC GCTGGAGCTG GAATCGTTGG TGTATGCACT	60
GCTTTGATGC TTCAACGTCG TGGATTCAA GTCACCTTGA TTGACCCGAA CCCTCCTGGC	120
GAAGGTGCAT CGTTTGGGAA TGCCGGATGC TTCAACGGCT CATCCGTCGT CCCTATGTCC	180
ATGCCGGGAA ACTTGACGAG CGTGCCGAAG TGGCTCCTTG ACCCGATGGG GCCGTTGTCA	240
ATCCGGTICA GCTATTTTCC AACCATCATG CCCTGGTTGA TTCGCTTTCT GTTAGCCGGA	300
AGACCAAACA AGGTGAAGGA GCAGGCGAAA GCACTCCGCA ATCTCATCAA GTCCACGGTG	360
CCTCTGATCA AGTCATTGGC GGAGGAGGCT GATGCGAGCC ATCTGAICCG CCATGAAGGT	420
CATCIGACCG TATATCGTGG AGAAGCAGAC TTCGCCAAGG ACCGCGGAGG TTGGGAACTG	480
CGGCGTCTCA ACGGTGTTCG CACGCAGATC CTCTCTGCTG ATGCTTTGCG TGATTTGAT	540
CCTAACTTGT CGCATGCTTT TACCAAGGGC ATTCTTATAG AAGAGAACGG TCACACGATT	600
AATCCGCAAG GGCTCGTGAC CCTCTTGTTT CGGCGTTTTA TCGCGAACGG TGGCGAATTT	660
GTATCTGCCG GTGTCAICGG TTTTGAGACT GAAGGTCGTG CTCTCAAAGG CATTACAACC	720
ACTAACGGTG TTCTGGCTGT TGATGCAGCT GTTGTTCAG CTGGTGCACA CTCTAAATCA	780
CTTGCTAATT CGCTAGGCCA TGACATCCCG CTCGATACCG AACGTGGATA TCATATCGTC	840
ATCGCGAATC CGGAAGCCGC TCCACGCATT CCGACGACCG ATGCGTCAGG AAAATTCATC	900
GCGACACCTA TGGAAATGGG TCTTCGTGTT GCTGGTACTG TTGAGTTTGC TGGTCTCACA	960
GCTGCTCCTA ACTGGAAACG TGCGCATGTG CTCTATACGC ACGCTCGAAA ACTTCTTCCA	1020
GCCCTCGCGC CTGCGAGTTC TGAAGAACGA TATTCCAAAT GGATGGGTTT TCGTCCTAGC	1080
ATTCCTGATT CTCTCCAGT GATTGGTCGT GCAACTCGTA CACCCGACGT AATCTATGCT	1140
TTTGGTCACG GTCATCTCGG TATGACAGGT GCTCCAATGA CTGCAACTCT CGTCTCAGAG	1200

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 1 6 8 5 4 4 C 2

Информация для ПОСЛЕД. № 8:

(I) Характеристики последовательности:

(A) Длина: 1296 шар оснований

(B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Число нитей: две

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)

(XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 8:

ATGGCTGAGA ACCACAAGAA GGTGGTATC GCTGGAGCTG GAATCGTTGG TGTTCACACT	60
GCTTTGATGC TTCAACGTCG TGGATTCAAG GTTACCTTGA TTGATCCAAA CCCACCAGGT	120
GAAGGTGCTT CTTTCGGTAA CGCTGGTTCG TTCAACGGTT CCTCCGTTGT TCCAATGTCC	180
ATGCCAGGAA ACTTGACTAG CGTTCCAAAG TGGCTTCTTG ACCCAATGGG TCCATTGTCC	240
ATCCGTTTCA GCTACTTTCC AACCATCATC CCTTGGTTGA TTCGTTTCTT GCTTGCTGGA	300
AGACCAAAACA AGGTGAAGGA GCAAGCTAAG GCACTCCGTA ACCTCATCAA GTCCACTGTG	360
CCTTTGATCA AGTCCTTGGC TGAGGAGGCT GATGCTAGCC ACCTTATCCG TCACGAAGGT	420
CACCTTACCG TGTACCGTGG AGAAGCAGAC TTCGCCAAGG ACCGTGGAGG TTGGGAACCT	480
CGTCGTCTCA ACGGTGTTCC TACTCAAATC CTCAGCGCTG ATGCATTGCG TGATTTGAT	540
CCTAACTTGT CTCACGCCTT TACCAAGGGA ATCCTTATCG AAGAGAACGG TCACACCATC	600
AACCCACAAG GTCTCGTGAC TCTCTTGTTT CGTCGTTTCA TCGCTAACGG TGGAGAGTTC	660
GTGTCTGCTC GTGTTATCGG ATTCGAGACT GAAGGTCGTG CTCTCAAGGG TATCACCACC	720
ACCAACGGTG TTCTTGCTGT TGATGCAGCT GTTGTTCAG CTGGTGCACA CTCCAAGTCT	780
CTTGCTAACT CCCTTGGTGA TGACATCCCA TTGGATACCG AACGTGGATA CCACATCGTG	840
ATCGCCAACC CAGAAGCTGC TCCACGTATT CCAACTACCG ATGCTTCTGG AAAGTTCATC	900
GCTACTCCTA TGGAGATGGG TCTTCGTGTT GCTGGAACCG TTGAGTTCGC TGGTCTCACT	960
GCTGCTCCTA ACTGGAAGCG TGCTCACGTT CTCTACACTC ACGCTCGTAA GTTGCTTCCA	1020
GCTCTCGCTC CTGCCAGTTC TGAAGAACGT TACTCCAAGT GGATGGGTTT CCGTCCAAGC	1080
ATCCAGATT CCCTTCCAGT GATTGGTCGT GCTACCCGTA CTCCAGACGT TATCTACGCT	1140
TTGGTTCACG GTCACCTCGG TATGACTGGT GCTCCAATGA CCGCAACCCT CGTTTCTGAG	1200
CTCCTCGCAG GTGAGAAGAC CTCTATCGAC ATCTCTCCAT TCGCACCAAA CCGTTTCGGT	1260
ATTGGTAAGT CCAAGCAAAC TGGTCCSTGCA TCCTAA	1296

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 9:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 279 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (рекомбинантная)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 9

AGATCTCCAC AATGGCTTCC TCTATGCTCT CTTCGGCTAC TATGGTTGCC TCTCCGGCTC 60
 AGGCCACTAT GGTTCGCTCCT TTCAACGGAC TTAAGTCCTC CGCTGCCTTC CCAGCCACCC 120
 GCAAGGCTAA CAACGACATT ACTTCCATCA CAAGCAACGG CGGAAGAGTT AACTGCATGC 180
 AGGTGTGGCC TCCGATTGGA AAGAAGAAGT TTGAGACTCT CTCTTACCTT CCTGACCTTA 240
 CCGATTCCGG TGGTCGCGTC AACTGCATGC AGGCCATGG 279

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 10:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 318 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология; линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (рекомбинантная)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 10:

AGATCTATCG ATAAGCTTGA TGTAATIGGA GGAAGATCAA AATTTTCAAT CCCCATTCTT 60
 CGATTGCTTC AATTGAAGTT TCTCCGATGG CGCAAGTTAG CAGAATCTGC AATGGTGTGC 120
 AGAACCCATC TCTTATCTCC AATCTCTCGA AATCCAGTCA ACGCAAATCT CCCTTATCGG 180
 TTTCTCTGAA GACGCAGCAG CATCCACGAG CTTATCCGAT TTCGTCTGTC TGGGGATTGA 240
 AGAAGAGTGG GATGACGTTA ATTGGCTCTG AGCTTCGTCC TCTTAAGCTC ATGTCTTCTG 300
 TTTCCACGGC GTGCATGC 318

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 11:
- (I) Характеристики последовательности:
- (A) Длина: 119 пар оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Число нитей: два
- (D) Топология: линейная
- (II) Молекулярный тип: ДНК (геномная)
- (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № II:

NCATGGACGT CTGATCGAAA TCGTCGTAC CGCAGCAAGG TAAAGGCACGC CGAATTTTAT 60
 CACCTACCGC GAAACGGTGG CTAGGCAGCG AGAGACTGTC GGCTCCGCGG GAGCATCCT 119

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 12:
- (I) Характеристики последовательности:
- (A) Длина: 277 пар оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Число нитей: две
- (D) Топология: линейная
- (II) Молекулярный тип: ДНК (геномная)
- (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 12

CTACTTACGC CCTCGTGAGT ACAGCGCAGA GCGCGTGTCA AGATCAATCT GCACCTCGCA 60
 ATCACCTCGG AGACGCGAAA TGGCGCAAT AGAACACATA TTAACGAGTC ACGCCCCGAA 120
 GCCTTTGGGT CACTACAGTC AGCGCGCCCG AGCGGGTGGG TTCATTGATG TTTCCGGTCA 180
 GCTTCGATC AAACCAGGAG GCCAGTCGGA GCAATCTGAC GATCTCGTGG ATAACCAGGC 240
 CAGTCTCGTT CTCGGGAATT TGCTGGCCGT ACTCGAG 277

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для последовательности № 13:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 33 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 13:
 GAGAGACTGT CGACTCGGGG GGAGCATCAT ATG
 (2) Информация для ПОСЛЕД. № 14:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 35 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 14:
 GAACGAATCC AAGCTTCTCA CGACCGCGTA AGTAC
 (2) Информация для ПОСЛЕД. № 15:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 24 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 15:
 GCCGAGATGA CCGTGGCCGA AAGC
 (2) Информация для ПОСЛЕД. № 16:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 24 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 16:
 GGAATGCCG GATGCTTCAA CGGC

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 17:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 1296 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей; две
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (рекомбинантная)
 (IX) Признаки: (A) Название/ключ: CDS
 (B) Местоположение: 1..1296
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 17:

CAC CTC GGT ATG ACT GGT GGT CCA ATG ACC GCA ACC CTC GTT TCT GAG	1200		
His Leu Gly Met Thr Gly Ala Pro Met Thr Ala Thr Leu Val Ser Glu			
385	390	395	400
CTC CTC GCA GGT GAG AAG ACC TCT ATC GAC ATC TCT CCA TTC GCA CCA	1248		
Leu Leu Ala Gly Glu Lys Thr Ser Ile Asp Ile Ser Pro Phe Ala Pro			
405	410	415	
AAC CGT TTC GGT ATT GGT AAG TCC AAG CAA ACT GGT CCT GCA TCC TAA	1296		
Asn Arg Phe Gly Ile Gly Lys Ser Lys Gln Thr Gly Pro Ala Ser			
420	425	430	

(XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 17:

ATG GCT GAG AAC CAC AAG AAG GTT GGT ATC GCT GGA GCT GGA ATC GTT	48
Met Ala Glu Asn His Lys Lys Val Gly Ile Ala Gly Ala Gly Ile Val	
1 5 10 15	
GGT GTT TGC ACT GCT TTG ATG CTT CAA CGT CGT GGA TTC AAG GTT ACC	96
Gly Val Cys Thr Ala Leu Met Leu Gln Arg Arg Gly Phe Lys Val Thr	
20 25 30	
TTG ATT GAT CCA AAC CCA CCA GGT GAA GGT GCC TCT TTC GGT AAC GCT	144
Leu Ile Asp Pro Asn Pro Pro Gly Glu Gly Ala Ser Phe Gly Asn Ala	
35 40 45	
GGT TGC TTC AAC GGT TCC TCC GTT GTT CCA ATG TCC ATG CCA GGA AAC	192
Gly Cys Phe Asn Gly Ser Ser Val Val Pro Met Ser Met Pro Gly Asn	
50 55 60	
TTG ACT AGC GTT CCA AAG TGG CTT CTT CAC CCA ATG GGT CCA TTG TCC	240
Leu Thr Ser Val Pro Lys Trp Leu Leu Asp Pro Met Gly Pro Leu Ser	
65 70 75 80	
ATC CGT TTC GGC TAC TTT CCA ACC ATC ATG CCT TGG TTG ATT CGT TTC	288
Ile Arg Phe Gly Tyr Phe Pro Thr Ile Met Pro Trp Leu Ile Arg Phe	
85 90 95	

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

TTG CTT GCT GGA AGA CCA AAC AAG GTG AAG GAG CAA GCT AAG GCA CTC	336		
Leu Leu Ala Gly Arg Pro Asn Lys Val Lys Glu Gln Ala Lys Ala Leu			
100	105	110	
CGT AAC CTC ATC AAG TCC ACT GTG CCT TTG ATC AAG TCC TTG GCT GAG	384		
Arg Asn Leu Ile Lys Ser Thr Val Pro Leu Ile Lys Ser Leu Ala Glu			
115	120	125	
GAG GCT GAT GCT AGC CAC CTT ATC CGT CAC GAA GGT CAC CTT ACC GTG	432		
Glu Ala Asp Ala Ser His Leu Ile Arg His Glu Gly His Leu Thr Val			
130	135	140	
TAC CGT GGA GAA GCA GAC TTC GCC AGG GAC CGT GGA GGT TGG GAA CTT	480		
Tyr Arg Gly Glu Ala Asp Phe Ala Arg Asp Arg Gly Gly Trp Glu Leu			
145	150	155	160
CGT CGT CTC AAC GGT GTT CGT ACT CAA ATC CTC AGC GCT GAT GCA TTG	528		
Arg Arg Leu Asn Gly Val Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ala Asp Ala Leu			
165	170	175	
CGT GAT TTC GAT CCT AAC TTG TCT CAC GCC TTT ACC AAG GGA ATC CTT	576		
Arg Asp Phe Asp Pro Asn Leu Ser His Ala Phe Thr Lys Gly Ile Leu			
180	185	190	
ATC GAA GAG AAC GGT CAC ACC ATC AAC CCA CAA GGT CTC GTG ACT CTC	624		
Ile Glu Glu Asn Gly His Thr Ile Asn Pro Gln Gly Leu Val Thr Leu			
195	200	205	
TTG TTT CGT CGT TTC ATC GCT AAC GGT GGA GAG TTC GTG TCT GCT CGT	672		
Leu Phe Arg Arg Phe Ile Ala Asn Gly Gly Glu Phe Val Ser Ala Arg			
210	215	220	
GTT ATC GGA TTC GAG ACT GAA GGT CGT GCT CTC AAG GGT ATC ACC ACC	720		
Val Ile Gly Phe Glu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Lys Gly Ile Thr Thr			
225	230	235	240

RU 2168544 C2

C2 168544 RU

ACC AAC GGT GTT CTT GCT GTT GAT GCA GCT GTT GTT GCA GCT GGT GCA	768		
Thr Asn Gly Val Leu Ala Val Asp Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Ala			
245	250	255	
CAC TCC AAG TCT CTT GCT AAC TCC CTT GGT GAT GAC ATC CCA TTG GAT	816		
His Ser Lys Ser Leu Ala Asn Ser Leu Gly Asp Asp Ile Pro Leu Asp			
260	265	270	
ACC GAA CGT GGA TAC CAC ATC GTG ATC GCC AAC CCA GAA GCT GCT CCA	864		
Thr Glu Arg Gly Tyr His Ile Val Ile Ala Asn Pro Glu Ala Ala Pro			
275	280	285	
CGT ATT CCA ACT ACC GAT GCT TCT GGA AAG TTC ATC GCT ACT CCT ATG	912		
Arg Ile Pro Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Phe Ile Ala Thr Pro Met			
290	295	300	
GAG ATG GGT CTT CGT GTT GCT GGA ACC GTT GAG TTC GCT GGT CTC ACT	960		
Glu Met Gly Leu Arg Val Ala Gly Thr Val Glu Phe Ala Gly Leu Thr			
305	310	315	320
GCT GCT CCT AAC TGG AAG CGT GCT CAC GTT CTC TAC ACT CGC GCT CGT	1008		
Ala Ala Pro Asn Trp Lys Arg Ala His Val Leu Tyr Thr Arg Ala Arg			
325	330	335	
AAG TTG CTT CCA GCT CTC GCT CCT GCC AGT TCT GAA GAA CGT TAC TCC	1056		
Lys Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ser Ser Glu Glu Arg Tyr Ser			
340	345	350	
AAG TGG AIG GGT TTT CGT CCA AGC ATC CCG GAT TCC CTT CCA GTG ATT	1104		
Lys Trp Met Gly Phe Arg Pro Ser Ile Pro Asp Ser Leu Pro Val Ile			
355	360	365	
GGT CGT GCT ACC CGT ACT CCA GAC GTT ATC TAC GCT TTC GGT CAC GGT	1152		
Gly Arg Ala Thr Arg Thr Pro Asp Val Ile Tyr Ala Phe Gly His Gly			
370	375	380	

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 18:
- (I) Характеристики последовательности:
- (A) Длина: 431 пара оснований
- (B) Тип: аминокислота
- (D) Топология: линейная
- (II) Молекулярный тип: белок
- (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 18:

```

Met Ala Glu Asn His Lys Lys Val Gly Ile Ala Gly Ala Gly Ile Val
  1                   5                   10                   15

Gly Val Cys Thr Ala Leu Met Leu Gln Arg Arg Gly Phe Lys Val Thr
                   20                   25                   30

Leu Ile Asp Pro Asn Pro Pro Gly Glu Gly Ala Ser Phe Gly Asn Ala
                   35                   40                   45

Gly Cys Phe Asn Gly Ser Ser Val Val Pro Met Ser Met Pro Gly Asn
                   50                   55                   60

Leu Thr Ser Val Pro Lys Trp Leu Leu Asp Pro Met Gly Pro Leu Ser
                   65                   70                   75                   80

```

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

	245	250	255
His Ser Lys Ser Leu Ala Asn Ser Leu Gly Asp Asp Ile Pro Leu Asp			
	260	265	270
Thr Glu Arg Gly Tyr His Ile Val Ile Ala Asn Pro Glu Ala Ala Pro			
	275	280	285
Arg Ile Pro Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Phe Ile Ala Thr Pro Met			
	290	295	300
Glu Met Gly Leu Arg Val Ala Gly Thr Val Glu Phe Ala Gly Leu Thr			
305	310	315	320
Ala Ala Pro Asn Trp Lys Arg Ala His Val Leu Tyr Thr Arg Ala Arg			
	325	330	335
Lys Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ser Ser Glu Glu Arg Tyr Ser			
	340	345	350
Lys Trp Met Gly Phe Arg Pro Ser Ile Pro Asp Ser Leu Pro Val Ile			
	355	360	365
Gly Arg Ala Thr Arg Thr Pro Asp Val Ile Tyr Ala Phe Gly His Gly			
	370	375	380
His Leu Gly Met Thr Gly Ala Pro Met Thr Ala Thr Leu Val Ser Glu			
385	390	395	400
Leu Leu Ala Gly Glu Lys Thr Ser Ile Asp Ile Ser Pro Phe Ala Pro			
	405	410	415
Asn Arg Phe Gly Ile Gly Lys Ser Lys Gln Thr Gly Pro Ala Ser			

RU 2168544 C2

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 19:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 29 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 19:
 CGTTCTCTAC ACTCGTGCTC GTAAGTTGC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 20:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 29 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 20:
 CGTTCTCTAC ACTAAGGCTC GTAAGTTGC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 21:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 29 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 21:
 CGTTCTCTAC ACTCAAGCTC GTAAGTTGC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 22:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 29 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 22:
 CGTTCTCTAC ACTGCTGCTC GTAAGTTGC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 23:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 32 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 23:
 CTCTACACTT GGGCTCGTAA GCTTCTTCCA GC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 24:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 32 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 24:
 CTCTACACTA TCGCTCGTAA GCTTCTTCCA CC

- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 25:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 32 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 25:
 СТСТАСАСТС TGGСТСGТАА GСТТСТТССА GC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 26:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 32 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 26:
 СТСТАСАСТG AAGСТСGТАА GСТТСТТССА GC
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 27: (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 62 пары оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 27:
 CGСТGGAACСТ GGAATCGTTG GTGTATGCAC TGСТТТGATG СТТCAACСТC GTGGATTCAA AG
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 28:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 65 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 28:
 GCAGATCСТC TCTGСТGATG СТТТGCGTGA ТТТCGATCСТ AACTTGTCTC ATGСТТТТАС САAGG
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 29:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 41 пара оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 29:
 GTСATСGGTT TTGAGACTGA AGGTCGTGCT СТСAAAGGCA T
- (2) Информация для ПОСЛЕД. № 30:
 (I) Характеристики последовательности:
 (A) Длина: 69 пар оснований
 (B) Тип: нуклеиновая кислота
 (C) Число нитей: одна
 (D) Топология: линейная
 (II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)
 (XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 30:

TACAACCACT AACGGTGTTC TGGCTGTTGA TGCAGCTGTT GTTGCAGCTG
GTGCACACTC TAAATCACT

(2) Информация для ПОСЛЕД. № 31:

(I) Характеристики последовательности:

- (A) Длина: 61 пара оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Число нитей: одна
- (D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)

(XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 31:

GGAAATGGGT CTTCTGTTG CTGCTACTGT TGAGTTTGCT GGTCTCACAG
CTGCTCCTAA C

(2) Информация для ПОСЛЕД. № 32:

(I) Характеристики последовательности:

- (A) Длина: 68 пар оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота
- (C) Число нитей: одна
- (D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)

(XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 32:

TGGATGGGT TCTCTCCTAG CATTCTGAT TCTCTTCCAG TGATTGGTCCG
TGCAACTCGT ACACCCGA

(2) Информация для ПОСЛЕД. № 33:

(I) Характеристики последовательности:

- (A) Длина: 69 пар оснований
- (B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Число нитей: одна

(D) Топология: линейная

(II) Молекулярный тип: ДНК (синтетическая)

(XI) Описание последовательности: ПОСЛЕД. № 33:

CGTAATCTAC GCTTTTGGTC ACGGTCTCT CGGTATGACA GGTCTCCTCAA
TGACTGCAAC TCTCGTCTC

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

Метаболизм глифозата под действием LBAA культуры

Образец	¹⁴ C (срт)
Контроль	18631
LBAA-культура	11327
LBAA надосадочная жидкость	6007
LBAA клетки	4932

Т а б л и ц а II

Активность превращения глифозата в АМФК в бесклеточных лизатах E.coli трансформантах

Клон	Добавление IPTG	Удельная активность (пмоли АМФК/мин.мг)
рМО № 7469#1	нет	<3
рМО № 7469#1	да	32
рМО № 7469#4	нет	<3
рМО № 7469#4	да	<3

Т а б л и ц а III

Активность по превращению глифозата в АМФК в бесклеточных лизатах E.coli трансформантов

Клон	Удельная активность (нмоли АМФК/мин.мг)
рМО № 7469#1	15,04
рМО № 7470	7,15

Т а б л и ц а IV

Праймеры для модификации кодирующей последовательности гена глифозат-оксидоредуктазы

Праймер 1 CGCTGGAGCT GTGGATTCAA	(149-210; 38-99) GGAATCGTTG AG (ПОСЛЕД. № 27)	GTGTATGCAC	TGCTTTGATG	СТТСААСГТС
Праймер 2 GCAGATCСТС ATGTTTTAC	(623-687; 512-576) TCTGCTGATG CAAGG (ПОСЛЕД. № 28)	СТТТГСГТГА	ТТТГСАТССТ	ААСТТГТСГС
Праймер 3 ГТСАТГГСТТ	(792-832; 681-721) ТТГАГАСТГА	АГГТСГТГСТ	СТСАААГГСА Т	(ПОСЛЕД. № 29)
Праймер 4 ТАСААССАСТ GTGCACACTC	(833-901; 722-790) AACGGTGTTС ТАААТСАСТ (ПОСЛЕД. № 30)	ТGGCTGTTGA	ТГСАГСТГТТ	ГТТГСАГСТГ
Праймер 5 GGAААТGGGT СТГСТССТАА	(1031-1091; 920-980) СТТСГТГТТГ С (ПОСЛЕД. № 31)	СТГГТАСТГТ	ТГАГТТТГСТ	GGTCTCACAG
Праймер 6 TGGATGGGTT TGCAACTCGA	(1179-1246; 1068-1135) ООСГТССТАГ АСАСССГА (ПОСЛЕД. № 32)	САТТССТГАТ	ТСТСТТССАГ	ТГАТТГГТГСГ
Праймер 7 CGTAATCTAC TGAСТГСААС	(1247-1315; 1136-1204) GCTTTTGGTC ТСТСГТСТС (ПОСЛЕД. № 33)	АСГГТСАТСТ	СГГТАТГАСА	GGTГСТССАА

Таблица А

Вариант	Каж. K_m (мМ)		Каж. V_m (Е/мг)		V_m/K_m	
	Глиф	ИДУ	Глиф	ИДУ	Глиф	ИДУ
дикого типа .247	27,0	2,8	0,8	0,5	0,03	0,18
	2,6	0,7	0,6	0,7	0,23	1,0

Таблица Б

Кинетический анализ выключателей доменов

Клон	Каж. K_m (мМ)	Каж. V_m (Е/мг)	V_m/K_m
w = (w1 w2 w3*)	28,4	0,65	0,022
v.247 (v1 v2 v3**)	2,1	0,72	0,34
w1 v2 w3	23,5	0,62	0,026
w1 v2 v3	2,1	0,6	0,28
w1 w2 v3	2,0	0,75	0,375
v1 w2 v3	2,6	0,55	0,21
v1 w2 w3	28,0	0,75	0,027
v1 v2 w3	26,7	0,55	0,021
* w1 = SER84;	w2 = LYS153;	w3 = HIS334	
** v1 = GLY84;	v2 = ARG153;	v3 = ARG334	

Таблица В

Кинетический анализ вариантов глифозат-оксидоредуктазы

Вариант	Каж. K_m (мМ)		Каж. V_m (Е/мг)		V_m/K_m	
	Глиф.	ИДУ	Глиф.	ИДУ	Глиф.	ИДУ
Дикого типа v.247	27,0	2,8	0,8	0,5	0,03	0,18
	2,6	0,7	0,6	0,7	0,23	1,0
ARG 334	2,6	0,5	0,6	0,6	0,23	1,2
LYS 334	9,9	1,3	0,7	0,8	0,07	0,62
CLN 334	19,6	3,5	0,6	0,7	0,03	0,20
ALA 334	26,7	3,5	0,2	0,2	0,007	0,057

Таблица В

Экспрессия модифицированного гена глифозат-оксидоредуктазы в табаке

(R1 трансгеники рMON17032)					
Число растений	Повторное каллюсообразование в присутствии глифозата (0,5 мМ глифозата)			Вестерн-анализ растений*	
	+	+/-	-	+	-
45	0	11	34	24	21

*+ означает 0,5-2 нг/50 мкг белка

- означает < 0,5 нг/50 мкг белка

Т а б л и ц а VI

Данные по опрыскиванию табака для рMON17032 R1 растений

Линия	Дозировка (кг/га)	Вегетативная оценка*		
		7 дней	14 дней	28 дней
18860	0,448	3	3	4
	1,12	1	1	2
18842	0,448	4	6	8
	1,12	2	3	6
18848	0,448	3	4	8
	1,12	2	2	6
18854	0,448	4	7	9
	1,12	2	5	8
18858	0,448	3	4	6
	1,12	1	2	4

Продолжение таблицы VI

Данные по опрыскиванию табака для рMON17032 R1 растений

Линия	Дозировка (кг/га)	Вегетативная оценка*		
		7 дней	14 дней	28 дней
18885	0,448	4	5	8
	1,12	2	1	2
18890	0,448	3	6	7
	1,12	1	2	3
Самсун	0,448	1	1	0
	1,12			

*Вегетативная оценка

0 - гибель

10 - никакого поддающегося обнаружению эффекта

Т а б л и ц а VII

Глифозат-оксидоредуктазная активность трансгенных растений табака

Растение	Удельная активность (нмоль/мин.мг)
Самсун	0 (не детектируется)
18881	0,039
18858	0,018

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

Экспрессия глифозат-оксидоредуктазы в табаке

Конструкт	Растение №	Вестерн-оценка
pMON17073 (обработана)	21270	0
	21281	0
	21286	1
	21929	1
pMON17066	21237	1
	21830	0
	21845	3
	21872	3
	21889	1
	21891	0
pMON17065 (синтетическая)	21199	0
	21208	2
	21211	2
	21217	0
	21218	2
	21792	1
	21795	0
	21811	2

Шкала Вестерн-оценок на 50 мкг белка

0 - глифозат-оксидоредуктаза не обнаруживается

1 - < 0,5 нг

2 - 0,5 - 2 нг

3 - > 2 нг

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

Данные по опрыскиванию глифозатом: рMON17066 (ХТIII-глифозат-оксидоредуктаза)
табак (R₀ растения)

Линия	Вестерн-оценка	Вегетативная оценка (Дозировка = 0,4 фунт/ар) (0,448 кг/га)				(дни после опрыскивания)
		7	14	28		
Контроль А	0	3	0	0	глифозат-оксидоредуктаза не обнаруживается	
Контроль В	0	3	1	0		
Контроль С	0	3	1	1		
22933	1	3	1	0	(рMON17073)	
22741	2	2	1	9	(рMON17065)	
22810	3	3	4	6	(рMON17066)	
22825	1	2	1	1	(рMON17066)	
22822	3	10	10	10	(рMON17066)	
22844	3	10	10	10	(рMON17066)	
22854	3	9	10	10	(рMON17066)	
22860	3	8	10	10	(рMON17066)	
22880	1	3	2	9	(рMON17066)	
22881	2	2	0	0	(рMON17066)	
22886	3	9	10	10	(рMON17066)	
22887	3	9	10	10	(рMON17066)	

Шкала Вестерн-оценок (на 50 мкг белка):

0 - глифозат-оксидоредуктаза не обнаруживается

1 - < 0,5 нг

2 - 0,5-2 нг

3 - > 2 нг

*Вегетативная оценка: 0 - гибель

10 - никакого видимого эффекта

Т а б л и ц а IX'

Глифозат-оксидоредуктазная активность в хлоропластах, выделенных из трансгенного табака

Субстрат	Удельная активность (гмоль/мин.мг)
Иминодиуксусная кислота	179
Глифозат	92

Т а б л и ц а X

Опыты по опрыскиванию глифозатом растений брюквы, содержащих рMON1738

Название линии	Партия	0,56 кг/га, оценка	
		14 ДПО	28 ДПО
		Вегетативная	Репродуктивная
17138-22	79	9	10
17138-30	79	9	10
17138-145	79	10	10
17138-158	79	8	10
17138-164	80	8	10
Без обработки	77	3	0
Без обработки	79	1	0

Опыты по опрыскиванию глифозатом растений брюквы, содержащих рMON17164

Конструкт	Партия	0,84 кг/га, оценка	
		14 ДПО	28 ДПО
		Вегетативная	Репродуктивная
17164-6	82	7	10
17164-9	83	8	10
17164-20	82	7	10
17164-25	83	8	10
17164-35	84	7	10
17164-45	83	9	10
17164-61	83	7	10
17164-75	84	7	10
17164-85	84	7	10
17164-97	84	6	10
17164-98	83	9	10
17164-105	83	7	10
17164-110	83	9	10
17164-115	83	7	10
17164-129	83	8	10
17164-139	83	7	10
17164-140	83	8	10
17164-164	83	7	10
17164-166	83	8	10
17164-174	83	8	10
17164-186	83	3	10
17164-202	83	8	10
17164-218	84	6	10
17164-219	83	9	10
17164-222	84	7	10
17164-225	83	7	10
17164-227	84	7	10
17164-230	83	8	10
17164-243	83	7	10
17164-247	84	7	10
17164-287	84	7	10
17164-289	83	8	10
17164-300	83	9	10
17164-337	83	8	10

Т а б л и ц а X I I

Опыты по опрыскиванию глифозатом растений сои, содержащих рMON17159

Линия	Партия	Оценка, 8,895 кг/га, 28 ДПО
17159-24	14	9
17159-25	14	9
17159-28	14	6
17159-40	14	4
17159-43	14	4
17159-71	14	10
17159-77	14	9
17159-81	15	4
Нетранс-формированная	14	0

Экспрессирование с помощью рMON19632 глифозат-оксидоредуктазы в каллюсе ЧМС кукурузы

Линия	СОХ экспрессия (% извлеченного белка)
ЕС9 (без СОХ)	0
T13-17	0,016
T13-16	0,0065
T13-15	0,016
T13-14	0,003
T13-12	0,0079
T13-7	0,01
T13-5	0,004
T13-18	0,026
T13-8	0,019
T13-9	0,01
T13-4	0,027

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

SspI

6358 TCATCAAAATATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAA
TCAACAAGGTACGAGCCATATCACTTTATTCAAATTGG
TATCGCCAAAACCAAGAAGGAACTCCCATCCTCAAAGG
TTTGTAAGGAAGAATTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAAG
GTCAGGGTACAGAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCT
ACAGGAGATCAATGAAGAATCTTCAATCAAAGTAACT
ACTGTTCCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAGTTTCAG
AAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCAT
CTTTGAAAGTAATCTTGTC AACATCGAGCAGCTGGCTT
GTGGGGACCAGACAAAAAAGGAATGGTGCAGAATTGTT
AGGCGCACCTACCAAAGCATCTTTGCCTTTATTGCAA
AAGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAGTGGGAACAA
AATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGACAGCCCACTCAC
TAATGCGTATGACGAACGCAGTGACGACCACAAAAGAA
TTTTCCCTCTATATAAGAAGGCATTTTCAT,CCCATTG
AAGGATCATCAGATACTAACCAATATTTCTC 6954
SspI

Фиг.1

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

1 NCATGGACGTCTGATCGAAATCGTCGTTACCGCAGCAAGGTAAGGCACGCCGAATTTTAT
 61 CACCTACCGCGAAACGGTGGCTAGGCAGCGAGAGACTGTCGGCTCCGCGGGAGCATCCTA
 M ('Met120')
 121 TGTCTGAGAACCACAAAAAGTAGGCATCGCTGGAGCCGGAATCGTCGGCGTATGCACGG
 S E N H K K V G I A G A G I V G V C T A
 181 CGCTGATGCTTCAGCGCCGCGGATTCAAAGTACCCTTGATTGACCCGAACCCCTCCTGGCG
 L M L Q R R G F K V T L I D P N P P G E
 241 AAGGTGCATCGTTTGGGAATGCCGGATGCTTCAACGGGCTCATCCGTGTCCTATGTCCA
 G A S F G N A G C F N G S S V V P M S M
 301 TGCCGGGAAACTTGACGAGCGTGCCGAAGTGGCTCCTTGACCCGATGGGGCCGTTGTCAA
 P G N L T S V P K W L L D P M G P L S I
 361 TCCGGTTCAGCTATTTTCCAACCATCATGCCCTGGTTGATTGCTTTCTGTTAGCCGGAA
 R F S Y F P T I M P W L I R F L L A G R
 421 GACCAAACAAGGTGAAGGAGCAGGCGAAAGCACTCCGCAATCTCATCAAGTCCACGGTGC
 P N K V K E Q A K A L R N L I K S T V P
 481 CTCTGATCAAGTCATTGGCGGAGGAGGCTGATGCGAGCCATCTGATCCGCCATGAAGGTC
 L I K S L A E E A D A S H L I R H E G H
 541 ATCTGACCGTATATCGTGGAGAAGCAGACTTCGCCAAGGACCGCGGAGGTTGGGAACTGC
 L T V Y R G E A D F A K D R G G W E L R
 601 GCGTCTCAACGGTGTTCGCACGCAGATCCTCAGCGCGGATGCGTTGCGGGATTTCGATC
 R L N G V R T Q I L S A D A L R D F D P
 SphI
 661 CGAACTTGTGCGATGCGTTTACCAAGGGCATTCTTATAGAAGAGAACGGTCACACGATTA
 N L S H A F T K G I L I E E N G H T I N
 EcoRI
 721 ATCCGCAAGGGCTCGTGACCCTCTTGTTCGGCGTTTTATCGCGAACGGTGGCGAATTCG
 P Q G L V T L L F R R F I A N G G E F V
 781 TATCTGCGCGTGTCTATCGGCTTTGAGACTGAAGGTAGGGCGCTTAAAGGCATTACAACCA
 S A R V I G F E T E G R A L K G I T T T
 841 CGAACGGCGTTCGCGCGTTGATGCAGCGGTTGTGCGAGCCGGCGCACACTCGAAATCAT
 N G V L A V D A A V V A A G A H S K S L
 EcoRV

Фиг.2А

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

901 TTGCTAATTCGCTAGGCGATGACATCCCGCTCGATACCGAACGTGGATATCATATCGTCA
 A N S L G D D I P L D T E R G Y H I V I
 961 TCGCGAATCCGGAAGCCGCTCCACGCATTCCGACGACCGATGCGTCAGGAAAATTCATCG
 A N P E A A P R I P T T D A S G K F I A
 1021 CGACACCTATGGAAATGGGGCTTCGCGTGGCGGGTACGGTTGAGTTCGCTGGGCTCACAG
 T P M E M G L R V A G T V E F A G L T A
 1081 CCGCTCCTAACTGGAAACGTGCGCATGTGCTCTATACGCACGCTCGAAAACCTCTCCAG
 A P N W K R A H V L Y T H A R K L L P A
 1141 CCCTCGCGCCTGCGAGTTCTGAAGAACGATATCCAAATGGATGGGGTTCGGGCCGAGCA
 L A P A S S E E R Y S K W M G F R P S I
 1201 TCCCGGATTCGCTCCCCGTGATTGGCCGGGCAACCCGGACACCCGACGTAATCTATGCTT
 P D S L P V I G R A T R T P D V I Y A F
 NcoI SacI
 1261 TCGGCCATGGTCATCTCGGCATGACAGGGGCGCCGATGACCGCAACGCTCGTCTCAGAGC
 G H G H L G M T G A P M T A T L V S E L
 1321 TCCTCGCAGGCGAAAAGACCTCAATCGACATTTCCGCCCTTCGCACCAAACCGCTTTGGTA
 L A G E K T S I D I S P F A P N R F G I
 ScaI
 1381 TTGGCAAATCCAAGCAAACGGGTCCGGCAAGTTAAGTACTTACGCGGTCTGTGAGTACAGC
 G K S K Q T G P A S ***
 1441 GCAGAGCCGGTGTCAAGATCAATCTGCACCTCGCAATCACCTCGGAGACGCGAAATGGCG
 1501 CAAATAGAACACATATTAACGAGTCACGCCCCGAAGCCTTTGGGTCACTACAGTCAGGGC
 1561 GCCCGAGCGGGTGGATTCATTCATGTTTCCGGTCAGCTCCGATCAAACCAGAAGGCCAG
 1621 TCGGAGCAATCTGACGATCTCGTCGATAACCAGGCCAGTCTCGTTCTCCGGAATTTGCTG
 XhoI
 1681 GCCGTA CTGAG

Фиг.2В

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

fMet

1 AGATCTCCATGGCTGAGAACCACAAAAAGTAGGCATCGCTGGAGCCGGA 50
--- T
51 ATCGTCGGCGTATGCACGGCGCTGATGCTTCAGCGCCGCGGATTCAAAGT 100
T T T TT A T T
101 CACCTTGATTGACCCGAACCCCTCCTGGCGAAGGTGCATCGTTTGGGAATG 150
151 CCGGATGCTTCAACGGCTCATCCGTCGTCCCTATGTCCATGCCGGGAAAC 200
201 TTGACGAGCGTGCCGAAGTGGCTCCTTGACCCGATGGGGCCGTTGTCAAT 250
251 CCGGTTGAGCTATTTTCCAACCATCATGCCCTGGTTGATTGCTTTCTGT 300
301 TAGCCGGAAGACCAAACAAGGTGAAGGAGCAGGCGAAAGCACTCCGCAAT 350
351 CTCATCAAGTCCACGGTGCCTCTGATCAAGTCATTGGCGGAGGAGGCTGA 400
401 TGCGAGCCATCTGATCCGCCATGAAGGTCACTGACCGTATATCGTGGAG 450
451 AAGCAGACTTCGCCAAGGACCGCGGAGGTTGGCAACTGCGGCGTCTCAAC 500
501 GGTGTTGCGACGCAGATCCTCAGCGCCGATGCGTTGCCGGGATTTGATCC 550
TCT T T T
551 GAACTTGTCGCATGCGTTTACCAAGGGCATTCTTATAGAAGAGAACGGTC 600
T T

Фиг.3А

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

601 ACACGATTAATCCGCAAGGGCTCGTGACCCCTCTTGTTTCGGCGTTTTATC 650
651 GCGAACGGTGGCGAATTTGTATCTGCGCGTGTGCATCGGCTTTGAGACTGA 700
T
701 AGGTAGGGCGCTTAAAGGCATTACAACCACGAACGGCGTTCTGGCCGTTG 750
C T T C T T T
751 ATGCAGCGGTGTGTCGCAGCCGGCGCACACTCGAAATCACTTGCTAATTCCG 800
T T T T T
801 CTAGGCGATGACATCCCGCTCGATACCGAACGTGGATATCATATCGTCAT 850
851 CGCGAATCCGGAAGCCGCTCCACGCATTCGACGACCGATGCGTCAGGAA 900
901 AATTCATCGCGACACCTATGGAATGGGGCTTCGCGTGGCGGGTACGGTT 950
T T T T T
951 GAGTTCGCTGGGCTCACAGCCGCTCCTAACTGGAAACGTGCGCATGTGCT 1000
T T T
1001 CTATACGCACGCTCGAAAACCTCTTCCAGCCCTCGCGCCTGCGAGTTCTG 1050
1051 AAGAACGATATTCCAAATGGATGGGGTTCCGGCCGAGCATCCCGGATTCCG 1100
T T T T T T T
1101 CTCCCCGTGATTGGCCGGGCAACCCGGACACCCGACGTAATCTATGCTTT 1150
T A T T T T
1151 CGGCCACGGTCATCTCGGCATGACAGGGGCGCCGATGACCGCAACGCTCG 1200
T T T T A T T
1201 TCTCAGAGCTCCTCGCAGGCGAAAAGACCTCAATCGACATTCGCCCTTC 1250
1251 GCACCAAACCGCTTTGGTATTGGCAAATCCAAGCAAACGGGTCCGGCAAG 1300
1301 TTAAGTGGGAATTCAAGCTTG 1321

STOP

Фиг.3В

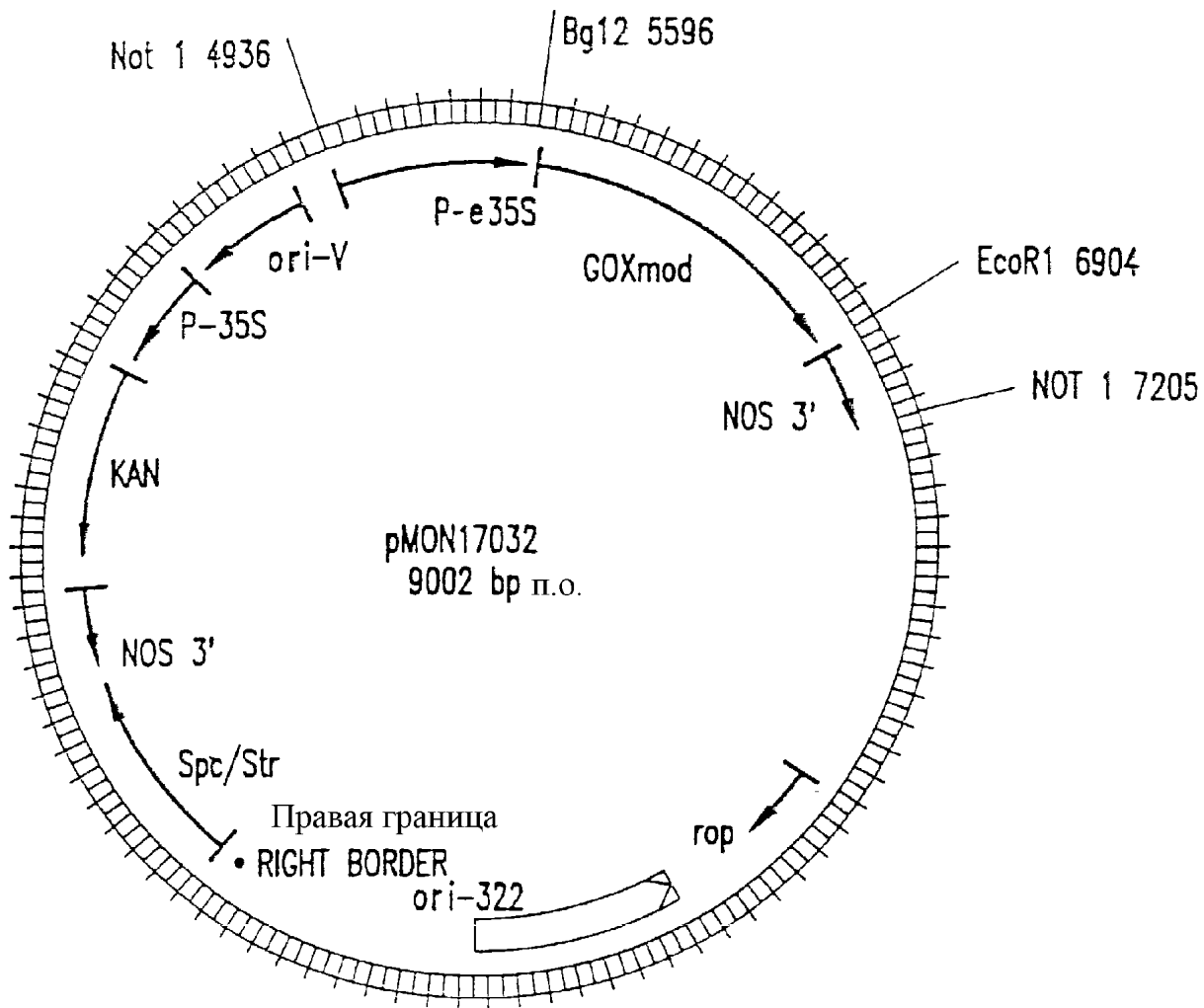
RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

601 ACACGATTAATCCGCAAGGGCTCGTGACCCTCTTGTTTCGGCGTTTTATC 650
C C C A T T T C
651 GCGAACGGTGGCGAATTTGTATCTGCGCGTGTTCATCGGCTTTGAGACTGA 700
T A G C G T T A C
701 AGGTAGGGCGCTTAAAGGCATTACAACCACGAACGGCGTTCTGGCCGTTG 750
C T T C G T C C C T T T
751 ATGCAGCGGTTGTTCGACGCCGGCGCACACTCGAAATCACTTGCTAATTCG 800
T T T T C G T C C
801 CTAGGCGATGACATCCCGCTCGATACCGAACGTGGATATCATATCGTCAT 850
T T A T G C C G
851 CGCGAATCCGGAAGCCGCTCCACGCATTCCGACGACCGATGCGTCAGGAA 900
C C A T T A T T T
901 AATTCATCGCGACACCTATGGAAATGGGGCTTCGCGTGGCGGGTACGGTT 950
G T T G T T T A C
951 GAGTTCGCTGGGCTCACAGCCGCTCCTAACTGGAAACGTGCGCATGTGCT 1000
T T T G T C T
1001 CTATACGCACGCTCGAAACTTCTTCCAGCCCTCGCGCCTGCGAGTTCTG 1050
C T T G T T T C
1051 AAGAACGATATTCCAAATGGATGGGGTTCGGGCCGAGCATCCCGGATTCG 1100
T C G T T A A C
1101 CTCCCCGTGATTGGCCGGGCAACCCGGACACCCGACGTAATCTATGCTTT 1150
T A T T T T T A T C
1151 CGGCCACGGTCATCTCGGCATGACAGGGGCGCCGATGACCGCAACGCTCG 1200
T C T T T T A C
1201 TCTCAGAGCTCCTCGCAGGCGAAAAGACCTCAATCGACATTCGCCCTTC 1250
T T T G T C T A
1251 GCACCAAACCGCTTTGGTATTGGCAAATCCAAGCAAACGGGTCCGGCAAG 1300
T C T G T T TC
1301 TTAAGTGGGAATTCAAGCTTG. 1321
C

RU 2168544 C2

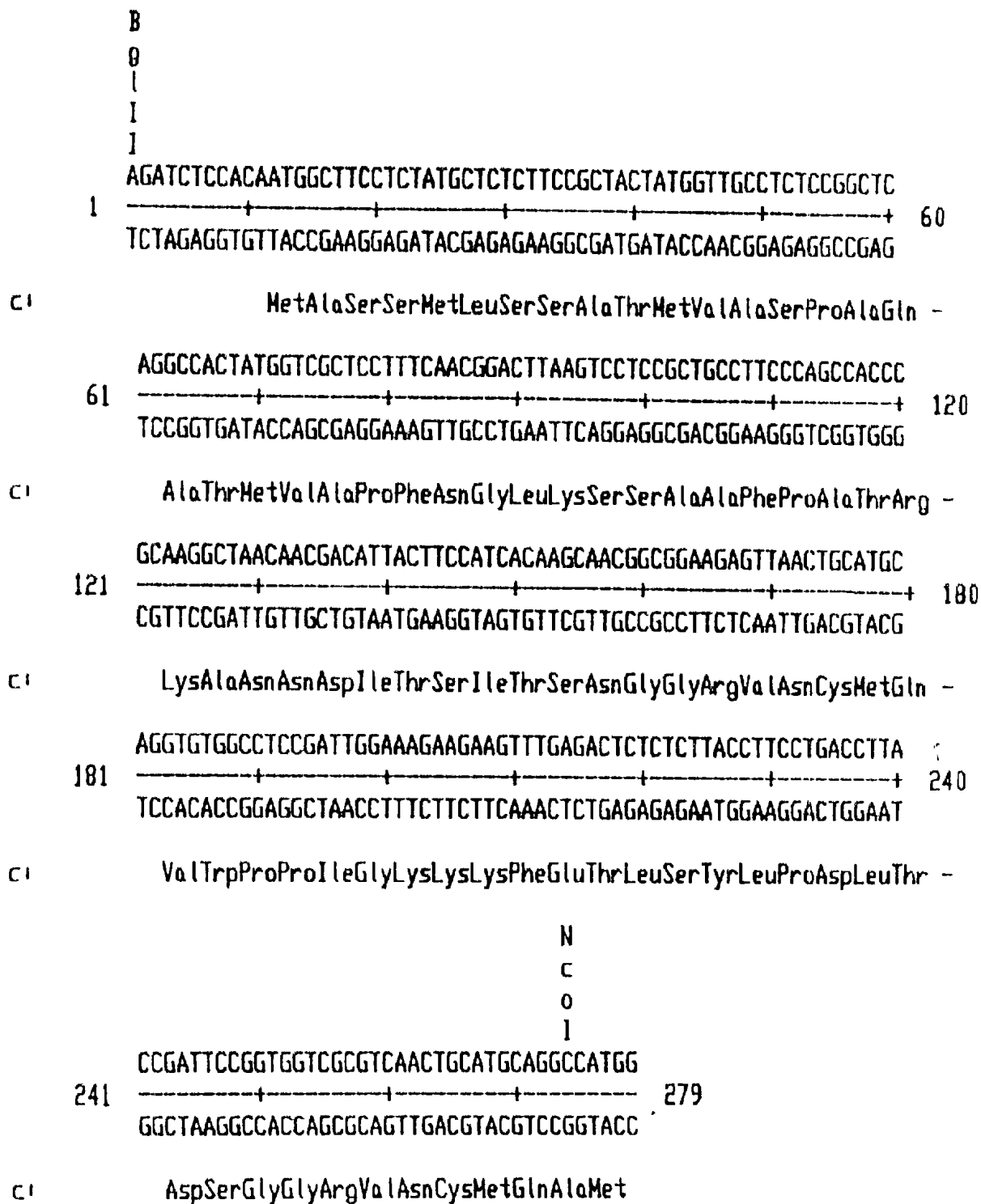
Фиг.4В



Фиг.5

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

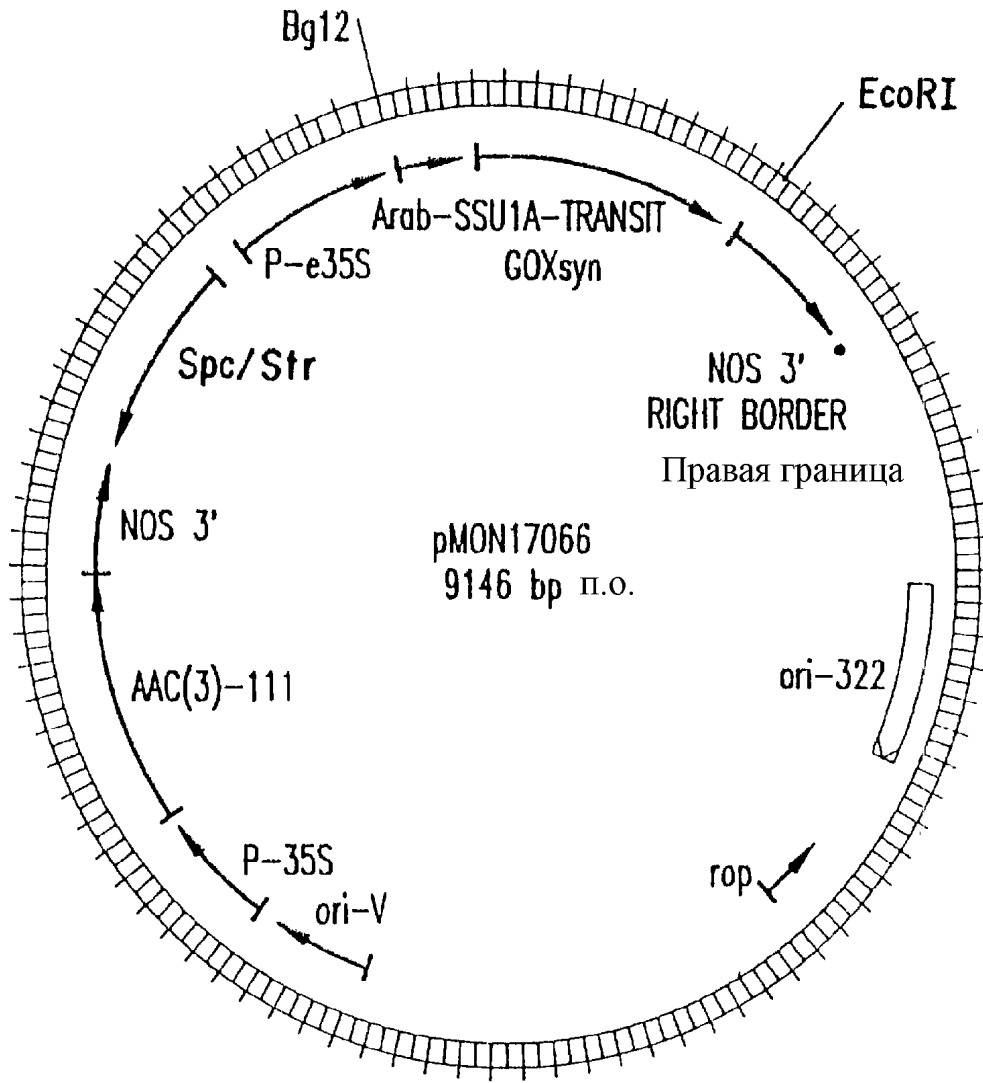
RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2



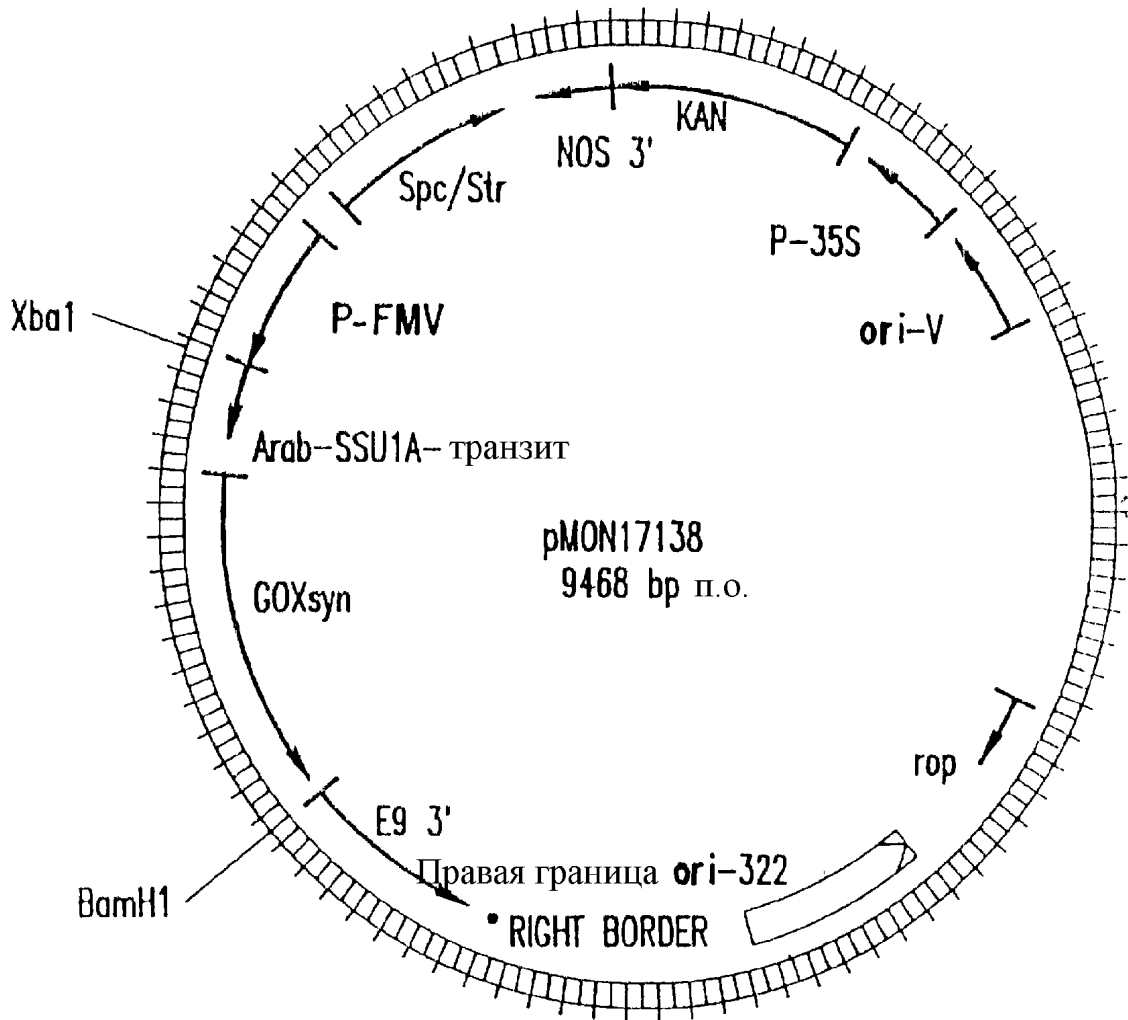
Фиг.6

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2

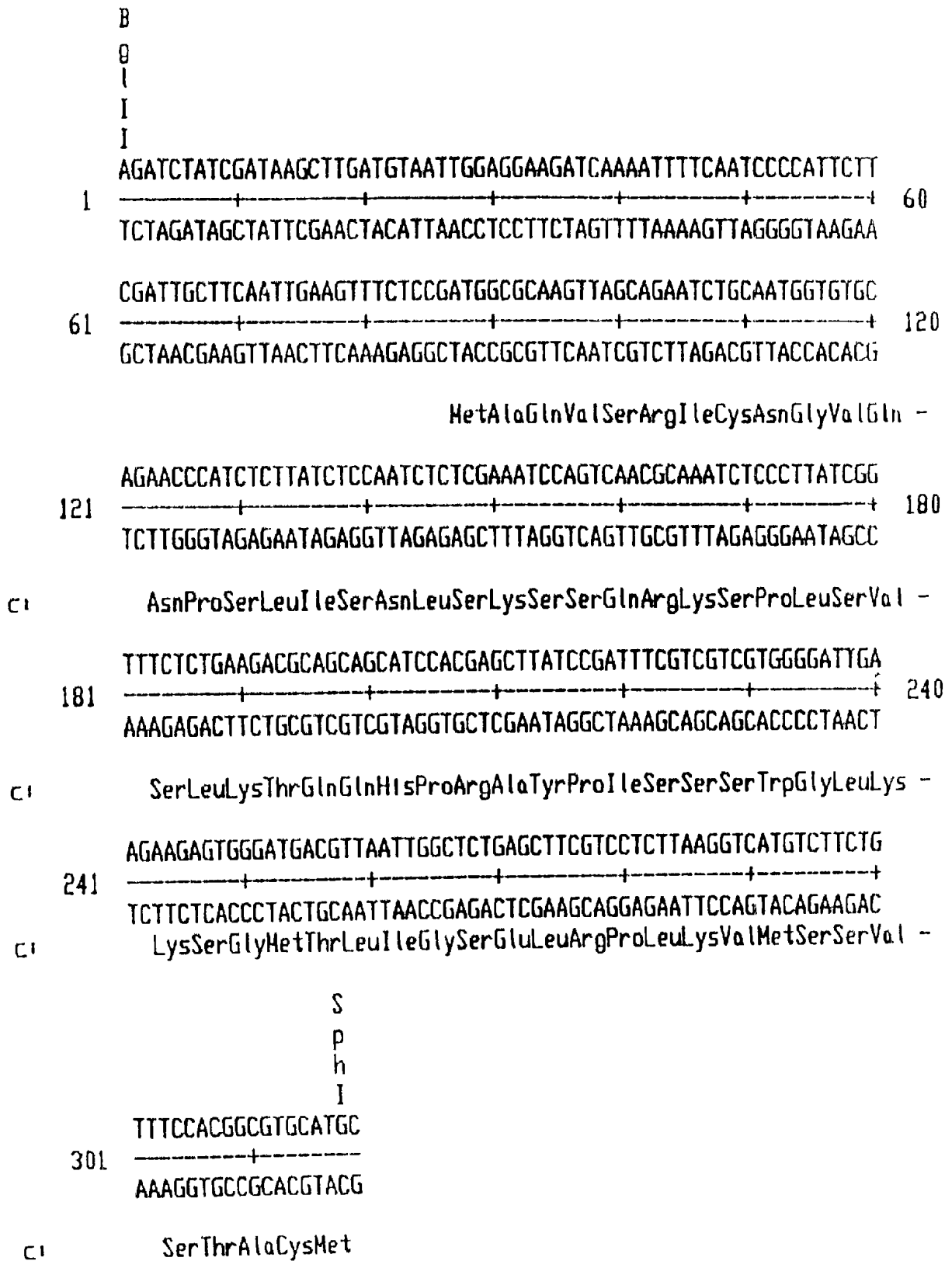


Фиг.7



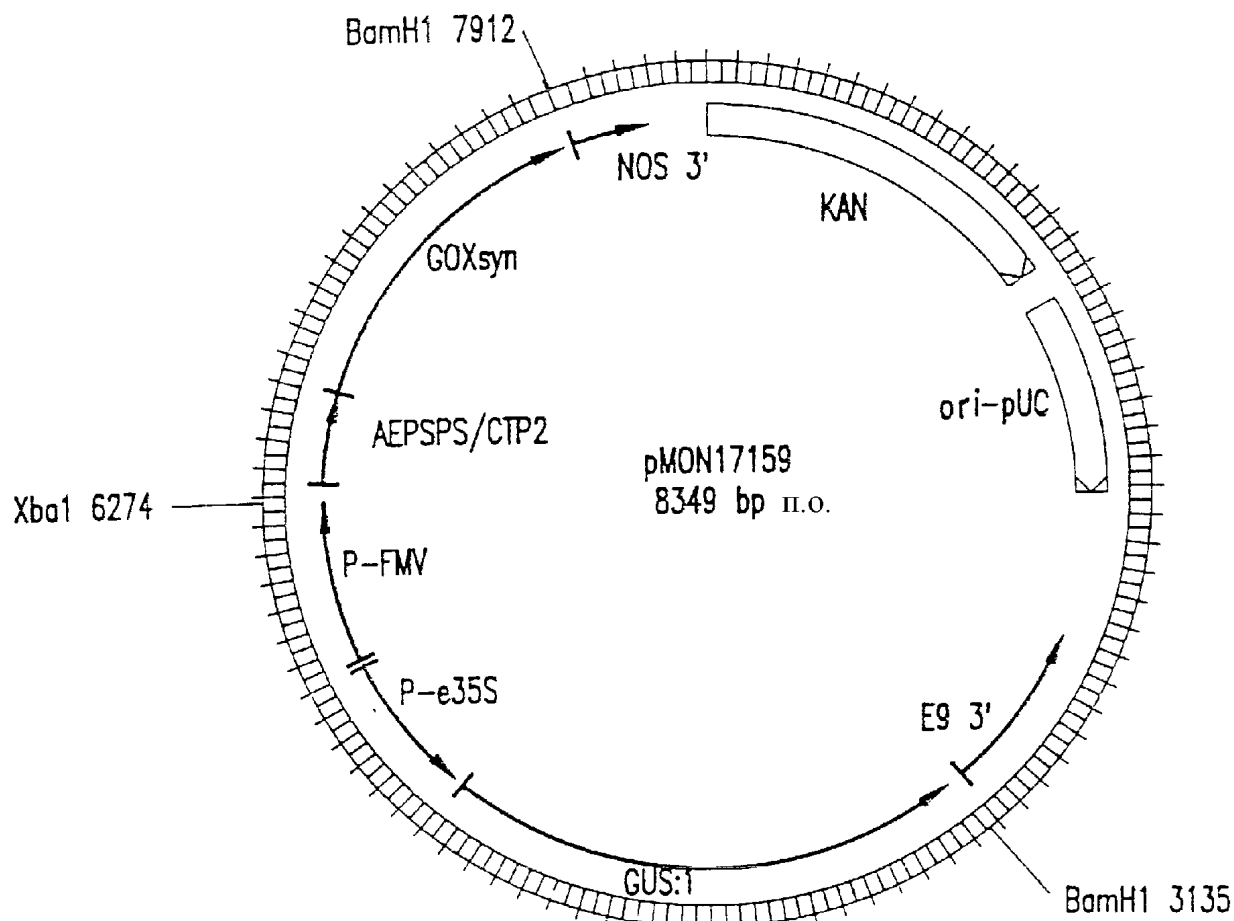
Фиг.8

RU 2168544 C2



RU 2168544 C2

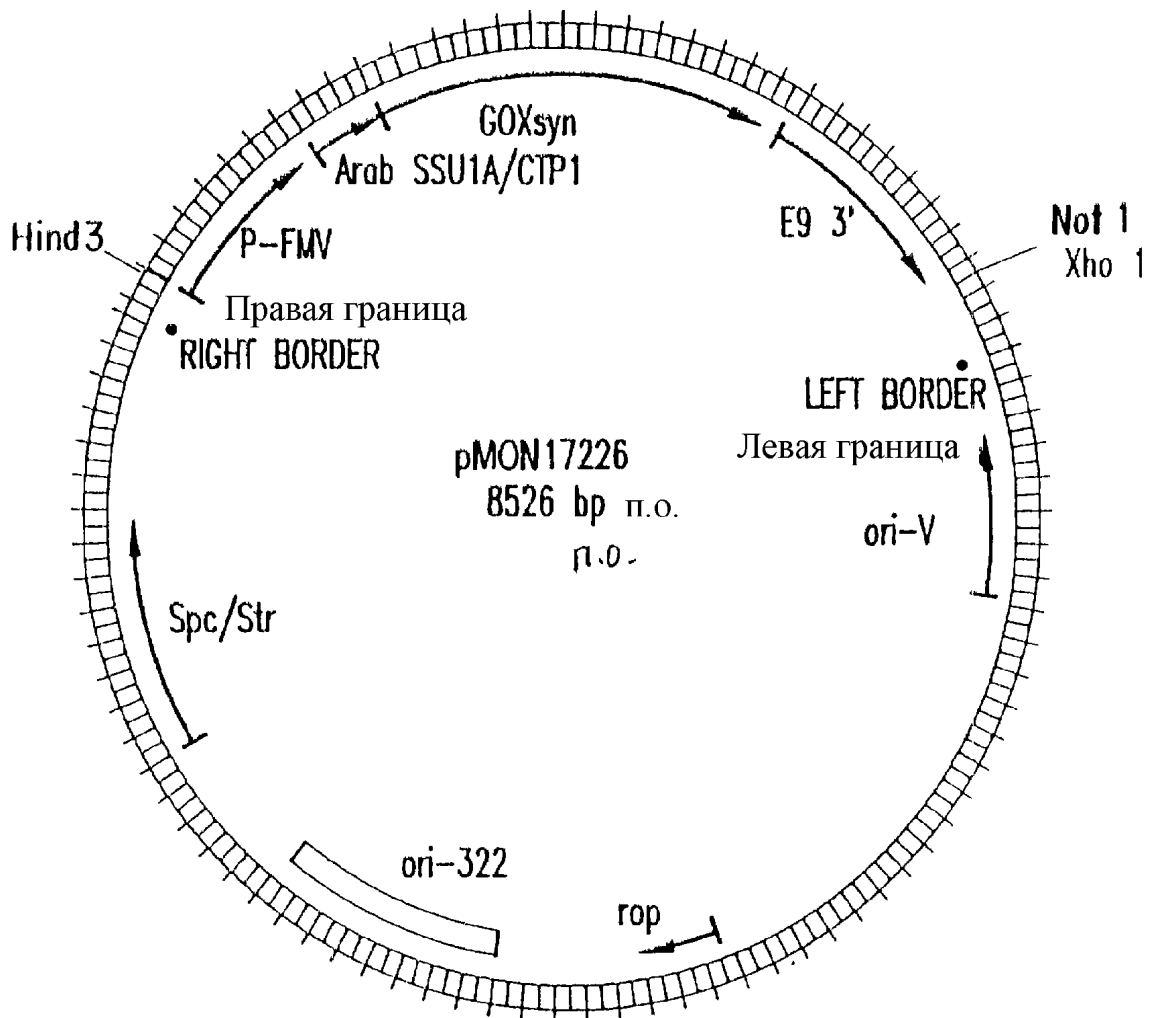
Фиг.9



Фиг.10

RU 2168544 C2

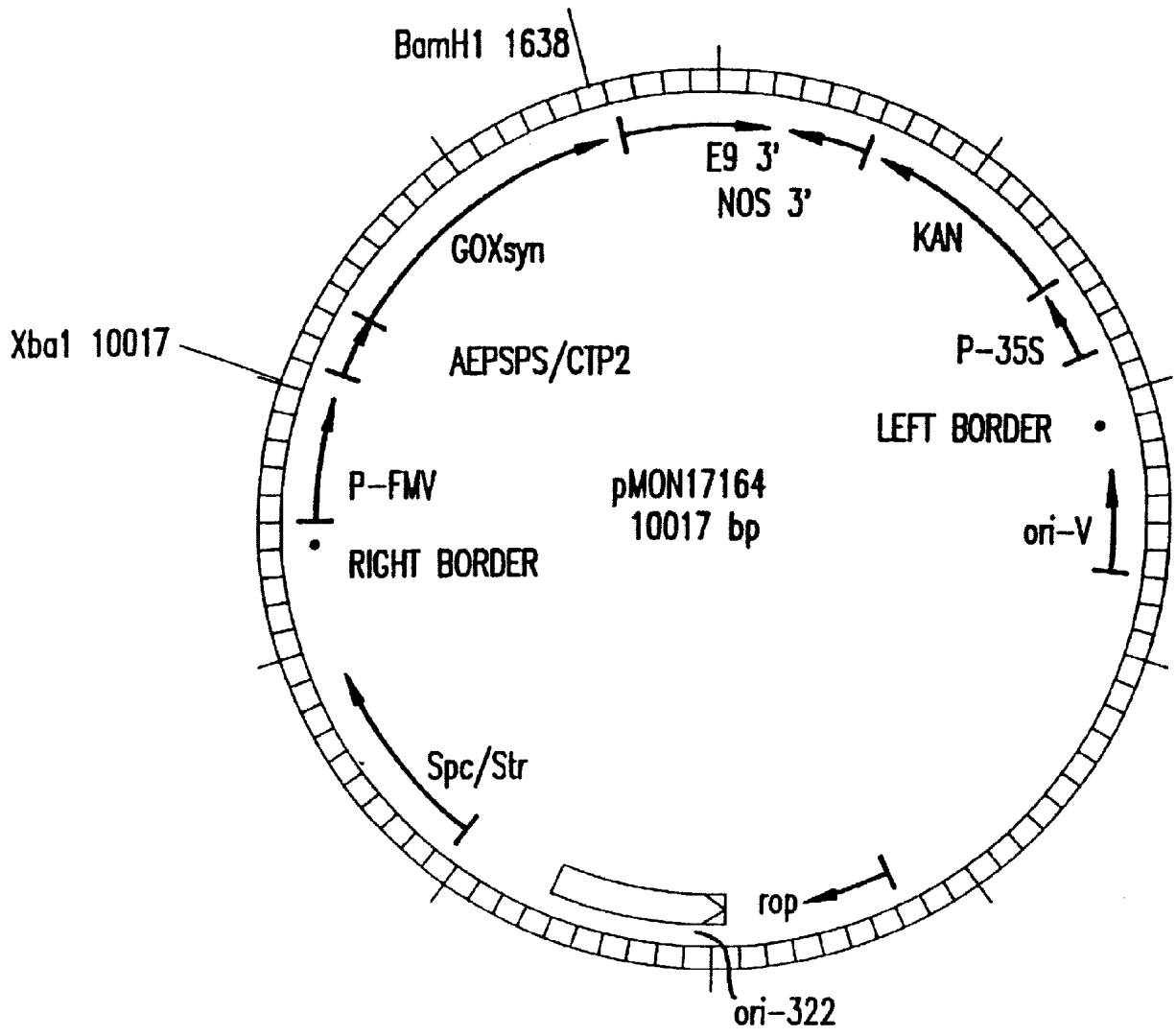
RU 2168544 C2



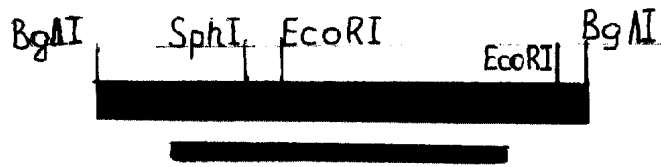
Фиг.11

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2

RU 2 1 6 8 5 4 4 C 2



Фиг.12



GOX кодирующая область

Фиг.13

RU 2168544 C2

RU 2168544 C2