



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.05

(21) Номер заявки
201201004

(22) Дата подачи заявки
2011.01.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ МИНИМИЗАЦИИ
СИНТЕЗА НОРНИКОТИНА В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

(31) 61/295,671

(32) 2010.01.15

(33) US

(43) 2013.02.28

(86) PCT/US2011/021088

(87) WO 2011/088180 2011.07.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОРТ КАРОЛИНА СТЕЙТ
ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
Дьюи Ралф Э., Льюис Рамси С. (US)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)

(56) WO-A2-2009064771
DATABASE EMBL [Online], 20 June
2008 (2008-06-20), "CHO_OF040xc14f1.ab1 CHO_OF
Nicotiana tabacum genomic 5', genomic survey sequence",
XP002629029, retrieved from EBI accession no.
EMBL:ET701936, Database accession no. ET701936, the
whole document

DATABASE EMBL [Online], 24 July 2009
(2009-07-24), "Nicotiana tabacum cDNA, clone:
TBK02GR0013_1_H12, 5'-end sequence", XP002629030,
retrieved from EBI accession no. EMBL:FS405337,
Database accession no. FS405337, the whole document

DATABASE EMBL [Online], 22 June
2008 (2008-06-22), "CHO_OF3490xi05r1.ab1 CHO_OF3
Nicotiana tabacum genomic 3', genomic survey sequence",
XP002629031, retrieved from EBI accession no.
EMBL:FH058766, Database accession no. FH058766, the
whole document

DATABASE EMBL [Online], 24 June 2008
(2008-06-24), "CHO_OF4790xg08f1.ab1 CHO_OF4
Nicotiana tabacum genomic 5', genomic survey sequence",

XP002629032, retrieved from EBI accession no.
EMBL:FH555036, Database accession no. FH555036, the
whole document

LEWIS RAMSEY S. ET AL.: "Three nicotine
demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in
Nicotiana tabacum L Functional characterization of the
CYP82E10 gene", PHYTOCHEMISTRY (AMSTERDAM),
vol. 71, no. 17-18, December 2010 (2010-12), pages
1988-1998, XP002629033, ISSN: 0031-9422, the whole
document

-& DATABASE EMBL [Online], 8 November 2010
(2010-11-08), "Nicotiana tabacum cultivar DH98-325-6
nicotine N-demethylase (CYP82E10) gene, complete
cds", XP002629034, retrieved from EBI accession no.
EMBL:HM802352, Database accession no. HM802352, the
whole document

ШАКРАВАТИ МАНОНАР ЕТ АЛ.:
"Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2
by degenerative mutations was a key event in the
evolution of the alkaloid profile of modern tobacco",
NEW PHYTOLOGIST, CAMBRIDGE UNIVERSITY
PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 175, no. 3, 1 August
2007 (2007-08-01), pages 565-574, XP002524136, ISSN:
0028-646X, DOI: DOI:10.1111/J.1469-8137.2007.02116.X
[retrieved on 2007-05-30], the whole document

GAVILANO LILY B. ET AL.: "Functional
analysis of nicotine demethylase genes reveals insights
into the evolution of modern tobacco", JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY
FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY,
INC, US, vol. 282, no. 1, 5 January 2007 (2007-01-05),
pages 249-256, XP002524135, ISSN: 0021-9258, DOI:
DOI:10.1074/JBC.M609512200 [retrieved on 2006-11-13],
the whole document

LEWIS RAMSEY S. ET AL.: "RNA interference
(RNAi)-induced suppression of nicotine demethylase
activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco
leaves", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 6,
no. 4, May 2008 (2008-05), pages 346-354, XP002629035,
ISSN: 1467-7652, the whole document

Dr. Nelson: "P450:CYP82", Metabolomics.JP,
20 June 2009 (2009-06-20), XP002629107, Retrieved
from the Internet: URL:http://metabolomics.jp/mediawiki/
index.php?title=P450:CYP82&printable=yes, the whole
document

(57) В изобретении представлены композиции и способы снижения уровня норникотина и N'-нитрозонорникотина (NNN) в растениях и частях растений табака. Композиции содержат выделенные полинуклеотиды и полипептиды специфических для корня никотиндеметилаз, CYP82E10, и их вариантов, которые принимают участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в этих растениях. Композиции, предлагаемые в изобретении, включают

также растения или части растения табака, которые содержат мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу СУР82Е10, при этом мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы СУР82Е10. В изобретении описаны также семена указанных растений табака или их потомство и табачные изделия, полученные из растений табака, предлагаемых в изобретении, или из частей растений или их потомства. В изобретении описаны также способы уменьшения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметираз, при этом мутация снижает экспрессию гена никотиндеметиразы и при этом первый из указанных генов никотиндеметираз кодирует специфическую для корня никотиндеметиразу, участвующую в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или частях растения табака. Способы находят применение в производстве табачных изделий, имеющих пониженные уровни норникотина и его онкогенного метаболита NNN, снижая тем самым онкогенный потенциал для индивидуумов, которые потребляют указанные табачные изделия или подвергаются воздействию вторичного дыма, образующегося из указанных изделий.

033565 B1

033565 B1

Информация о включении перечня последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей предоставляется через EFS-Web в виде электронной версии перечня последовательностей в формате ASCII (американский стандартный код обмена информацией), файл обозначен как "13521766SeqListReplacement.txt", он создан 20 января 2015 г., имеет размер 150 кБ и зарегистрирован одновременно с описанием изобретения для замены. Перечень последовательностей, входящий в указанный документ в формате ASCII, представляет собой часть описания изобретения и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, предназначенным для минимизации синтеза норникотина и, следовательно, его метаболита N'-нитрозонорникотина, в растениях и частях растений табака, прежде всего к композициям и способам, предназначенным для ингибирования экспрессии или функции специфической для корня никотиндеметилазы в сочетании с никотиндеметилазой зеленых листьев и индуцированной старением никотиндеметилазой.

Предпосылки создания изобретения

Преобладающим алкалоидом, присутствующим в коммерческих сортах табака, является никотин, на долю которого, как правило, приходится 90-95% от общего пула алкалоидов. Остальная часть алкалоидной фракции состоит в основном из трех дополнительных пиридиновых алкалоидов: норникотина, анабазина и анатабина. Норникотин образуется непосредственно из никотина в результате активности фермента никотин-N-деметилазы. На долю норникотина, как правило, приходится менее 5% от общего пула пиридиновых алкалоидов, но в результате процесса, который называют "превращением (конверсией)", растения табака, в которых первоначально продуцируются очень небольшие количества норникотина, дают потомство, в котором происходит метаболическое "превращение" большого процента присутствующего в листьях никотина в норникотин. В растениях табака, которых подвергали генетическому превращению (обозначены как "конвертеры") основная часть производства норникотина имеет место в процессе старения и сушки зрелых листьев (томление) (Wernsman и Matzinger, *Tob. Sci.* 12, 1968, с. 226-228). Табак сорта Бёрли особенно подвержен генетическому превращению, уровень которого для некоторых культиваров достигает 20% на поколение.

В процессе сушки и переработки листьев табака часть норникотина в результате метаболизма превращается в такое соединение, как N-нитрозонорникотин (NNN), специфический для табака нитрозамин (TSNA), который, как было установлено в опытах на лабораторных животных, является канцерогенным (Hecht и Hoffmann, *Cancer Surveys* 8, 1990, с. 273-294; Hoffmann и др., *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 1994, с. 1-52; Hecht, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1998, с. 559-603). Было установлено, что при трубоогневой сушке табака TSNA формируются главным образом в результате взаимодействия алкалоидов с очень небольшими количествами оксидов азота, которые присутствуют в газообразных продуктах сгорания, образующихся в системах прямого огневого нагрева, используемых в традиционных сушильных амбарах (Peele и Gentry, "Formation of Tobacco-specific Nitrosamines in Flue-cured Tobacco", CORESTA Meeting, Agro-Phyto Groups, Сучжоу, Китай, 1999). Переоснащение этих сушильных амбаров теплообменниками фактически устраняет смешение газообразных продуктов сгорания с воздухом, применяемым для сушки, и резко снижает образование TSNA в листьях табака, которые подвергали сушке таким образом (Boyette и Hamm, *Rec. Adv. Tob. Sci.* 27, 2001, с. 17-22.). В противоположность этому, в подвергаемом воздушной сушке табаке сорта Бёрли образование TSNA происходит, прежде всего, в результате взаимодействия алкалоидов табака с нитритом, этот процесс катализируется живущими в листьях микроорганизмами (Bush и др., *Rec. Adv. Tob. Sci.* 27, 2001, с. 23-46). В результате попытки снизить уровень TSNA посредством модификации условий сушки с сохранением при этом соответствия стандартам качества оказались безуспешными для табака, подвергаемого воздушной сушке.

Результаты современных исследований позволяют предположить, что норникотин, присутствующий в табачных изделиях, помимо того, что он служит в качестве предшественника NNN, может оказывать дополнительные нежелательные воздействия на здоровье. Dickerson и Janda (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, с. 15084-15088) продемонстрировали, что норникотин вызывает неправильную гликацию белков в клетке.

Обнаружено, что в плазме курильщиков концентрации модифицированных норникотином белков являются существенно более высокими по сравнению с плазмой некурящих. В этом же исследовании установлено, что норникотин может ковалентно модифицировать обычно назначаемые стероидные лекарственные средства, такие как преднизон. Указанные модификации могут изменять как эффективность, так и токсичность указанных лекарственных средств. Кроме того, опубликованы результаты исследований, в которых установлена связь норникотина, присутствующего в табачных изделиях, с возрастной дегенерацией желтого пятна, врожденными дефектами и болезнью пародонта (Brogan и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2005, с. 10433-10438; Katz и др., *J. Periodontol.* 76, 2005, с. 1171-1174).

В табаке сорта Бёрли обнаружена положительная корреляция между содержанием норникотина в листьях и количеством NNN, накапливаемом в высушенном продукте (Bush и др., *Rec. Adv. Tob. Sci.* 27, 2001, с. 23-46; Shi и др., *Tob. Chem. Res. Conf.* 54, реферат 27, 2000). Таким образом, стратегии, обеспечивающие эффективное снижение содержания норникотина в листьях, могут не только сами по себе спо-

способствовать снижению потенциальных негативных воздействий норникотина на состояние здоровья, что описано выше, но также могут параллельно снижать уровни NNN. Указанная корреляция нашла дополнительное подтверждение в современном исследовании Lewis и др., Plant Biotech. J. 6, 2008, с. 346-354, в котором продемонстрировано, что снижение уровней норникотина с использованием трансгенной конструкции для РНКi (РНК-интерференция), мишенью которой является ген CYP82E4v2, кодирующий индуцируемую старением никотиндеметилазу, приводит к сопутствующему снижению содержания NNN в высушенном листе. Хотя в указанном исследовании продемонстрировано, что для значительного снижения содержания норникотина и NNN в табаке можно применять трансгенные технологии, сочетание проблем, связанных с общественным мнением и интеллектуальной собственностью, очень затрудняет их применения для коммерциализации продуктов, полученных из трансгенных растений.

Таким образом, существует выраженная потребность в способах эффективной минимизации накопления норникотина в табаке, которая не основана на применении трансгенов.

Краткое изложение сущности изобретения

Предложены композиции и способы, предназначенные для минимизации содержания норникотина в растениях и частях растений табака. Композиции содержат выделенный специфический для корней полинуклеотид цитохрома P450, обозначенный как полинуклеотид CYP82E10, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 1, и кодируемый им полипептид никотиндеметилазы CYP82E10, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, и его варианты и фрагменты, включая (но не ограничиваясь только ими) полипептиды, которые имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5-12 или 13, а также полинуклеотиды, которые кодируют полипептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5-12 или 13. Полипептид CYP82E10, предлагаемый в изобретении, представляет собой никотиндеметилазу, которая принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений табака. Выделенные полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают также полинуклеотиды, которые содержат последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или 4, и ее варианты и фрагменты. Композиции, предлагаемые в изобретении, включают также растения или части растений табака, которые имеют мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E10, при этом мутация приводит к снижению экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10. В некоторых вариантах осуществления изобретения растения табака, предлагаемые в изобретении, содержат также мутацию в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E4, и/или мутацию в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E5, при этом мутация в этих генах приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E4 или CYP82E5. Изобретение относится также к семенному материалу этих растений табака или их потомству и к табачным изделиям, приготовленным из растений табака, предлагаемых в изобретении, или из частей этих растений или их потомства.

Предложены также способы снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растениях или частях растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилазы, где мутация снижает уровень экспрессии гена никотиндеметилазы, и где первый из этих генов никотиндеметилазы кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях или частях растений табака. В некоторых вариантах осуществления изобретения специфическая для корня никотиндеметилаза представляет собой CYP82E10 или ее вариант. В других вариантах осуществления изобретения способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который кодирует CYP82E10 или ее вариант, и мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который кодирует CYP82E4 или ее вариант, и/или гена никотиндеметилазы, который кодирует CYP82E5 или ее вариант. Описаны также способы идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, в которых растения или часть растения подвергают скринингу в отношении присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E10 или ее вариант, индивидуально или в сочетании со скринингом в отношении присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E4 или ее вариант, и/или присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E5 или ее вариант.

Под объем изобретения подпадают следующие варианты осуществления.

1. Растение или часть растения табака, содержащее/содержащая мутацию в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10.

2. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 1, где никотиндеметилаза CYP82E10 имеет последовательность, выбранную из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, 5-8 и 9.

3. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 1 или 2, где мутация приводит к модификации никотиндеметилазы CYP82E10 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 79, 107, 381, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

4. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 3, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену остатком серина остатка глицина в положении 79;
- б) замену остатком серина остатка пролина в положении 107;
- в) замену остатком серина остатка пролина в положении 381;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 419; и
- д) любую их комбинацию.

5. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-4, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E4, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E4.

6. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 5, где последовательность никотиндеметиразы CYP82E4 выбрана из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 14-19 и 20.

7. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 5 или 6, где мутация приводит к модификации никотиндеметиразы CYP82E4 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 329, 364, 376, 381 и 458, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

8. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 7, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- б) замену остатком аспарагина остатка лизина в положении 364;
- в) замену остатком метионина остатка валина в положении 376;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 381;
- д) замену остатком серина остатка пролина в положении 458; и
- е) любую их комбинацию.

9. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-8, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E5, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E5.

10. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 9, где последовательность никотиндеметиразы CYP82E5 выбрана из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26-31 и 32.

11. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 9 или 10, где мутация приводит к модификации никотиндеметиразы CYP82E5 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 422 и 449, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

12. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 11, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
- б) замену остатком лейцина остатка пролина в положении 449; и
- в) любую их комбинацию.

13. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 9-12, которое/которая содержит мутацию в гене никотиндеметиразы CYP82E10 и гене никотиндеметиразы CYP82E4.

14. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-13, где растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

15. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 14, где никотиндеметиразу CYP82E10 содержит мутацию в положении 381, никотиндеметиразу CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и никотиндеметиразу CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

16. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 15, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену остатком серина остатка пролина в положении 381;
- б) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- в) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422; и
- г) любую их комбинацию.

17. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 13-16, где в растении или его части превращается в норникотин меньше 1,5% никотина.

18. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 17, где в растении или его части превращается в норникотин не более 0,5% никотина.

19. Семя растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18 или его потомство.

20. Табачное изделие, изготовленное из растения или части растения табака или его потомства по одному из вариантов осуществления изобретения 1-19.

21. Способ снижения онкогенного потенциала табачного изделия, заключающийся в том, что приготавливают табачное изделие из растения или части растения табака или его потомства по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18.

22. Способ снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении табака или части растения табака, заключающийся в том, что интродуцируют в геном растения мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилазы, где мутация снижает экспрессию указанного гена никотиндеметилазы и где первый из указанных генов никотиндеметилазы кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или части растения табака.

23. Способ по варианту осуществления изобретения 22, в котором специфическая для корня никотиндеметилаза представляет собой никотиндеметилазу CYP82E10, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5-9 или 10; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5-9 или 10.

24. Способ по варианту осуществления изобретения 23, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E10 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 79, 107, 381, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

25. Способ по варианту осуществления изобретения 24, в котором замена в положении 79, 107, 381 или 419 представляет собой замену на остаток серина.

26. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-25, в котором второй из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E4.

27. Способ по варианту осуществления изобретения 26, в котором никотиндеметилаза CYP82E4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21.

28. Способ по варианту осуществления изобретения 27, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E4 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 329, 364, 381, 458 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

29. Способ по варианту осуществления изобретения 28, в котором замена представляет собой замену в положении 329 на стоп-кодон, замену в положении 364 на остаток аспарагина, замену в положении 381 на остаток серина, замену в положении 458 на остаток серина или любую их комбинацию.

30. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-29, в котором третий из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E5.

31. Способ по варианту осуществления изобретения 30, в котором никотиндеметилаза CYP82E5 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26-31 или 32; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26-31 или 32.

32. Способ по варианту осуществления изобретения 31, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E5 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 422 и 449 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

33. Способ по варианту осуществления изобретения 32, в котором замена представляет собой замену в положении 422 на стоп-кодон, замену в положении 449 на остаток лейцина или любую их комбинацию.

34. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-33, в котором растение или часть растения табака является гомозиготным по указанной мутации.

35. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-34, в котором интродукция предусматривает применение протокола селекции.

36. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-35, в котором растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

37. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18, где растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

38. Способ идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, заключающийся в том, что подвергают скринингу образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 1 или 3.

39. Способ по варианту осуществления изобретения 38, в котором растение табака не является конвертером.

40. Способ по варианту осуществления изобретения 38 или 39, в котором скрининг осуществляют с использованием последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, 3, 35-37 и 38.

41. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 38-40, заключающийся также в том, что подвергают скринингу указанный образец ДНК или другой образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 14, присутствия мутации в SEQ ID NO: 26 или присутствия мутации в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 26.

42. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

б) нуклеотидную последовательность, которая содержит фрагмент, состоящий по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

в) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 97% идентична полной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где полинуклеотид кодирует полипептид, который принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении;

г) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 5-13, или его фрагмент, содержащий по меньшей мере 115 смежных остатков;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, последовательность которого идентична по меньшей мере на 98% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13; и

е) нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности по одному из предыдущих подпунктов (а)-(д).

43. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13;

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13; и

в) аминокислотную последовательность, которая представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13, где фрагмент содержит по меньшей мере 115 смежных остатков аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13.

44. Растение или часть растения табака, гомозиготное/гомозиготная по мутации в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E10, гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E4, и гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E5, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E10, CYP82E4 и CYP82E5, где никотиндеметиразу CYP82E10 содержит мутацию в положении 381, никотиндеметиразу CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и никотиндеметиразу CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

45. Мутация в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E10, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E10.

46. Растение, имеющее мутацию в гене CYP82E10, которая ингибирует активность никотиндеметиразы в корнях, мутацию в гене CYP82E4v2, которая ингибирует активность никотиндеметиразы в стареющих листьях, и мутацию в гене CYP83E5, которая ингибирует активность никотиндеметиразы в зеленых листьях.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1A-1B - последовательности ДНК (SEQ ID NO: 4) и предсказанные белковые последовательности гена никотиндеметиразы CYP82E10. Кодированные белок последовательности обозначены прописными буквами, а 5'- и 3'-фланкирующие последовательности обозначены строчными буквами. Интронная последовательность (SEQ ID NO: 3) обозначена строчными буквами и выделена курсивом. Номера нуклеотидных последовательностей представлены слева, а номера белковых последовательностей представлены справа. Нуклеотидные последовательности, соответствующие ПЦР-праймам, применяемым для специфической амплификации экзона 1 при скрининге мутаций, подчеркнуты (не выделены жирным шрифтом), а подчеркнутые последовательности, которые выделены жирным шрифтом, обозначают сайты специфических для экзона 2 праймеров. Индивидуальные нуклеотиды и аминокислотные остатки, которые, как установлено с помощью скрининга мутаций (табл. 2), можно изменять, подчеркнуты и выделены жирным шрифтом;

на фиг. 2A-2B - сравнительный анализ первичной структуры геномных последовательностей CYP82E10 (SEQ ID NO: 4), CYP82E5v2 (SEQ ID NO: 38) и CYP82E4v2 (SEQ ID NO: 37). Кодированные белок последовательности обозначены прописными буквами; 5'- и 3'-нетранслируемые области обозначены строчными буквами; а интронные последовательности обозначены строчными буквами и курсивом. Идентичные положения в последовательностях обозначены затемненными прямоугольниками;

на фиг. 3 - данные, полученные с помощью тонкослойной хроматографии, об активности никотиндеметилазы микросомальных мембран из клеток дрожжей, которые экспрессируют CYP82E10 и несущую мутацию Ser381Pro (S381P) CYP82E10, которая получена из растения 1041. СРМ обозначает число импульсов в минуту;

на фиг. 4А и 4Б - средний процент превращения никотина в растениях табака сорта Бёрли, несущих различные комбинации мутаций в локусах CYP82E4v2, CYP82E5v2 и CYP82E10. Средние значения, обозначенные различными буквами, обозначают достоверные различия с уровнем $P < 0,05$.

Описание последовательностей, входящих в перечень последовательностей

Ниже представлена информация о последовательностях, входящих в перечень последовательностей. Использовали стандартное обозначение аминокислотных замен. Так, например, CYP82E10 P419S обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток серина в положении 419, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E10, которая представлена в SEQ ID NO: 2. В качестве другого примера: CYP82E4 P38L обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток лейцина в положении 38, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E4, которая представлена в SEQ ID NO: 14. И в качестве еще одного примера: CYP82E5 P72L обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток лейцина в положении 72, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E5, которая представлена в SEQ ID NO: 26.

- SEQ ID NO: 1 соответствует кодирующей последовательности CYP82E10.
- SEQ ID NO: 2 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10.
- SEQ ID NO: 3 соответствует нуклеотидной последовательности интрона CYP82E10.
- SEQ ID NO: 4 соответствует геномной последовательности CYP82E10.
- SEQ ID NO: 5 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 L148F.
- SEQ ID NO: 6 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 G172R.
- SEQ ID NO: 7 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 A344T.
- SEQ ID NO: 8 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 A410T.
- SEQ ID NO: 9 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 R417H.
- SEQ ID NO: 10 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 P419S.
- SEQ ID NO: 11 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 G79S.
- SEQ ID NO: 12 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 P107S.
- SEQ ID NO: 13 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10 P381S.
- SEQ ID NO: 14 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4.
- SEQ ID NO: 15 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 P38L.
- SEQ ID NO: 16 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 D171N.
- SEQ ID NO: 17 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 E201K.
- SEQ ID NO: 18 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 R169Q.
- SEQ ID NO: 19 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 G459R.
- SEQ ID NO: 20 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 T427I.
- SEQ ID NO: 21 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 V376M.
- SEQ ID NO: 22 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 W329Stop.
- SEQ ID NO: 23 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 K364N.
- SEQ ID NO: 24 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 P381S.
- SEQ ID NO: 25 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 P458S.
- SEQ ID NO: 26 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5.
- SEQ ID NO: 27 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P72L.
- SEQ ID NO: 28 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 L143F.
- SEQ ID NO: 29 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 S174L.
- SEQ ID NO: 30 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 M224I.
- SEQ ID NO: 31 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P235S.
- SEQ ID NO: 32 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 A410V.
- SEQ ID NO: 33 s соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 W422Stop.
- SEQ ID NO: 34 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P449L.
- SEQ ID NO: 35 соответствует последовательности "прямого" праймера экзона 1 CYP82E10.
- SEQ ID NO: 36 соответствует последовательности "обратного" праймера экзона 1 CYP82E10.
- SEQ ID NO: 37 соответствует последовательности "прямого" праймера экзона 2 CYP82E10.
- SEQ ID NO: 37 соответствует последовательности "обратного" праймера экзона 2 CYP82E10.
- SEQ ID NO: 38 соответствует геномной последовательности CYP82E4v2.
- SEQ ID NO: 39 соответствует геномной последовательности CYP82E5v2.

Определения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, предназначенным для ингибирования экспрессии или функции специфических для корня полипептидов никотиндеметилазы, которая при-

нимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растения, прежде всего растений рода *Nicotiana*, включая растения табака различных коммерческих сортов.

В контексте настоящего описания понятия "ингибировать", "ингибирование", "ингибирующий" относятся к снижению экспрессии или функции представляющего интерес генного продукта (т.е. генного продукта-мишени), в данном случае никотиндеметилазы, такой как специфическая для корня никотиндеметилаза, предлагаемая в изобретении, что оценивают с помощью любого метода, известного в данной области, или представленного в настоящем описании. Установлено, что полипептиды никотиндеметилазы можно ингибировать с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области, включая смысловое и антисмысловое подавление, подавление на основе РНКi, подходы, предусматривающие "выключение", такие как мутагенез, и т.п. Наиболее предпочтительными являются методы, приводящие к "выключению" или частичному подавлению ("замалчиванию") экспрессии и/или функции указанных специфических для корня никотиндеметилаз, прежде всего подходы на основе мутагенеза, которые позволяют осуществлять селекцию в отношении предпочтительных мутаций в гене CYP82E10 никотиндеметилазы.

Под "предпочтительной мутацией" подразумевают мутацию, которая приводит к замене, инсерции, делеции или укорочению полипептида CYP82E10, в результате чего ингибируется его никотиндеметилазная активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения никотиндеметилазная активность ингибируется по меньшей мере на 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% по сравнению с активностью полипептида CYP82E10 дикого типа в одинаковых условиях тестирования. В других вариантах осуществления изобретения никотиндеметилазная активность ингибируется по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения предпочтительная мутация обеспечивает полное ингибирование (т.е. 100%-ное ингибирование), и никотиндеметилазная активность является "выключенной" (т.е. уровень активности находится ниже предела измерения).

"Ингибирование" можно рассматривать с позиций сравнения между двумя растениями, например, генетически измененного растения и растения дикого типа. Можно осуществлять сравнение между растениями, например, растением дикого типа и растением, в котором отсутствует последовательность ДНК, обладающая способностью продуцировать специфическую для корня никотиндеметилазу, которая превращает никотин в норникотин. Ингибирование экспрессии или функции генного продукта-мишени можно рассматривать также с позиций сравнения между растительными клетками, органеллами, органами, тканями или частями растения, присутствующими в одном и том же растении, или между различными растениями, и это понятие включает сравнение между стадиями развития или ограниченными временем стадиями развития одного и того же растения или части растения или между растениями или частями растений.

"Ингибирование" может включать любое относительное уменьшение функции или производства представляющего интерес генного продукта, в данном случае специфической для корня никотиндеметилазы, вплоть до и включительно полного элиминирования функции или производства указанного генного продукта. При сравнении уровней генного продукта указанное сравнение предпочтительно осуществляют между организмами со сходным генетическим фоном. Предпочтительно сходный генетический фон представляет собой фон, при котором для организмов характерна идентичность последовательностей ядерного генетического материала, составляющая 50% или более, более предпочтительно 75% или более и еще более предпочтительно 90% или более. Сходный генетический фон представляет собой фон, при котором, если сравниваемые организмы представляют собой растения, растения являются изогенными за исключением любого генетического материала, первоначально интродуцированного с помощью методов трансформации растений или с помощью мутации, созданной благодаря вмешательству человека. Оценку уровня или количества генного продукта можно осуществлять с помощью любого приемлемого метода, примерами которого являются (но не ограничиваясь только ими) сравнение уровней мРНК-транскриптов, уровней белков или пептидов и/или фенотипа, прежде всего касательно превращения никотина в норникотин. В контексте настоящего описания мРНК-транскрипты могут представлять собой процессированные и непроцессированные мРНК-транскрипты, а полипептиды или пептиды могут представлять собой полипептиды или пептиды, которые имеют какую-либо пост-трансляционную модификацию или не имеют ее.

В контексте настоящего описания "вариант" означает практически сходную последовательность. Вариант может обладать другой функцией или практически сходной функцией с представляющим интерес полипептидом дикого типа. Касательно никотиндеметилазы практически сходная функцию представляет собой функцию, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 95, 90, 85, 80, 75, 60, 50, 25 или 15% соответствует свойственной ферменту дикого типа функции по превращению никотина в норникотин в таких же условиях или в практически изогенной линии. Последовательность CYP82E10 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 2. Последовательность CYP82E4 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 14. Последовательность CYP82E5 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 26. Примеры вариантов CYP82E10 дикого типа, предлагаемые в настоящем изобретении, включают полипептиды, которые содержат последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5-12 или 13. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 10 (CYP82E10 P419S), является наличие предпочти-

тельной мутации, результатом которой является то, что фермент обладает только примерно 25% никотиндеметилазной активности полипептида CYP82E10 дикого типа. Особенностью вариантов, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11 (CYP82E10 G79S), SEQ ID NO: 12 (CYP82E10 с P107S) и SEQ ID NO: 13 (CYP82E10 с P381S), является наличие предпочтительных мутаций, результатом которых является "выключение" их никотиндеметилазной активности (т.е. 100% ингибирование, приводящее к получению нефункционального полипептида). Аналогично этому, примерами вариантов CYP82E4 дикого типа являются полипептиды, которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15-24 или 25. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 21 (CYP82E4 V376M), является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является то, что фермент обладает только примерно 50% никотиндеметилазной активности полипептида CYP82E4 дикого типа. Особенностью вариантов, последовательность которых представлена в SEQ ID NO: 22 (CYP82E4 W329Stop), SEQ ID NO: 23 (CYP82E4 K364N), SEQ ID NO: 24 (CYP82E4 P381S) и SEQ ID NO: 25 (CYP82E4 P458S), является наличие предпочтительных мутаций, результатом которых является "выключение" их никотиндеметилазной активности (т.е. 100% ингибирование). Аналогично этому, примерами вариантов CYP82E5 дикого типа являются полипептиды, которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27-33 или 34. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 34 (CYP82E5 P449L), является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является ингибирование его никотиндеметилазной активности, а особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 33, является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является "выключение" его никотиндеметилазной активности (т.е. 100% ингибирование).

В контексте настоящего описания "вариант полинуклеотида" или "вариант полипептида" означает, что нуклеотидная или аминокислотная последовательность не представляет собой последовательность дикого типа.

Вариант может иметь одно/одну добавление, делецию или замену; два или меньшее количество добавлений, делеций или замен; три или меньшее количество добавлений, делеций или замен; четыре или меньшее количество добавлений, делеций или замен; или пять или меньшее количество добавлений, делеций или замен. Мутация может приводить к добавлениям, делециям и заменам. Указанные делеции или добавления могут затрагивать С-конец, N-конец или и С-, и N-концы. Под объем настоящего изобретения подпадают также слитые полипептиды или меченные эпитопом полипептиды. "Молчащие" мутации нуклеотидов не изменяют кодируемую аминокислоту в данном положении. Аминокислотные замены могут быть консервативными. Консервативная замена представляет собой замену аминокислоты на аминокислоту из такого же семейства аминокислот, что и исходная аминокислота. Семейство определяется боковой цепью индивидуальных аминокислот. Семейство аминокислот может иметь основные, кислотные, незаряженные полярные или неполярные боковые цепи (см. Alberts и др., *Molecular biology of the cell*, 3-е изд., изд-во Garland Publishing Inc., New York, New York, 1994, с. 56-57), публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Делеция, замена или добавление может затрагивать аминокислоту другого представителя семейства CYP82E в этом положении. В контексте настоящего описания "фрагмент" означает часть полинуклеотида или часть полипептида и, следовательно, кодируемого белка.

В контексте настоящего описания понятие "часть растения" обозначает клетки растения, протопласты растения, культуры тканей, клеток растения, из которых можно регенерировать целое растение, каллусы растения, маточные корневища растения и клетки растения, которые являются интактными в растениях или частях растений, такие как зародыши, пыльца, пыльниковые мешки, семяпочки, семена, листья, цветки, стебли, ветви, плоды, корни, верхушечные корни и т.п. Под объем настоящего изобретения подпадают также потомство, варианты и мутанты регенерированных растений, при условии, что они содержат интродуцированные полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении. В контексте настоящего описания понятие "материал растения табака" обозначает любую составляющую часть растения или любые комбинации частей растения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новому гену никотиндеметилазы, CYP82E10 (геномная последовательность представлена в SEQ ID NO: 4), и к кодируемой им никотиндеметилазе CYP82E10 (SEQ ID NO: 2), которая участвует в специфическом для корня превращении никотина в норникотин в корнях растений табака, и к их применению для снижения или минимизации превращения никотина в норникотин и, как следствие, к снижению уровней норникотина в растениях и частях растений табака. Под "специфической для корня" подразумевается экспрессия, происходящая главным образом в корнях растений табака, в отличие от других органов растения, таких как листья или семена. Путем интродукции отобранных предпочтительных мутаций в указанную специфическую для корня никотиндеметилазу или ее варианты, которые обладают никотиндеметилазной активностью, в сочетании с интродукцией одной или нескольких отобранных предпочтительных мутаций в ген, который кодирует присутствующую в зеленых листьях никотиндеметилазу (например, CYP82E5, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 26) или ее вариант, который обладает никотиндеметилазной активностью, а также в сочетании с

интродукцией одной или нескольких отобранных предпочтительных мутаций в ген, который кодирует индуцируемую старением никотиндеметиразу (например, CYP82E4, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 14) или ее вариант, который обладает никотиндеметиразной активностью, можно получать нетрансгенные растения табака, которые отличаются минимальным превращением никотина в норникотин, в которых уровень превращения составляет менее примерно 1,5%, предпочтительно менее примерно 1%.

Пониженные уровни норникотина в табаке являются очень желательными, поскольку этот алкалоид служит предшественником хорошо известного карциногена N'-нитрозонорникотина (NNN). Два гена, которые кодируют белки, обладающие никотиндеметиразной активностью в табаке, были ранее идентифицированы и обозначены как CYP82E4v2 и CYP82E5v2. Полипептид CYP82E4 (SEQ ID NO: 14) представляет собой индуцируемую старением никотиндеметиразу. Ген CYP82E4v2 (включающий кодирующую и интронную области), его роль в производстве норникотина в растениях табака и методы ингибирования его экспрессии и функции описаны в заявке на патент США № 11/580765, которая опубликована в виде публикации заявки на патент США № 2008/0202541 A1. Полипептид CYP82E5 (SEQ ID NO: 26) представляет собой присутствующую в зеленых листьях никотиндеметиразу (т.е. экспрессия которой главным образом происходит в зеленых листьях). Ген CYP82E4 (включающий кодирующую и интронную области), его роль в производстве норникотина в растениях табака и методы ингибирования его экспрессии и функции описаны в заявке на патент США № 12/269531, которая опубликована в виде публикации заявки на патент США № 2009/0205072 A1. Содержание двух указанных заявок на патент США и соответствующие их публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Однако растения, гомозиготные по предпочтительным мутантным аллелям *сур82е4v2* и *сур82е5v2* (т.е. мутантные аллели, которые обеспечивают "замалчивание" или "выключение" экспрессии указанных соответствующих генов никотиндеметиразы), все еще могут метаболизировать более 2% присутствующего в них никотина в норникотин, т.е. приводить к получению уровней норникотина, которые все еще могут приводить к заметному образованию NNN. Открытие гена CYP82E10 никотиндеметиразы представляет собой дополнительный путь минимизации уровня превращения никотина в норникотин в растениях табака и таким образом дополнительного снижения уровней норникотина и, следовательно NNN, в растениях табака и полученных из них растительных материалах. Объединение предпочтительных мутантных аллелей *сур82е10* с предпочтительными мутантными аллелями *сур82е4v2* и *сур82е5v2* позволяет получать растения табака, отличающиеся снижением более чем в 3 раза уровня норникотина по сравнению с растениями табака, которые несут только мутацию *сур82е4v2* или в сочетании с мутацией *сур82е5v2*. Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения являются гены никотиндеметиразы, гомозиготные по комбинации трех мутантов (*сур82е4v2*, *сур82е5v2* и *сур82е10*), которые позволяют получать нетрансгенные растения табака, в которых продуцируются очень низкие уровни норникотина по сравнению с уровнями, которые ранее были достигнуты на основе подходов подавления с помощью трансгенов, например, описанных в публикациях заявок на патент США № 2008/0202541 A1 и 2009/0205072 A1.

Полинуклеотиды и полипептиды никотиндеметираз и их варианты и фрагменты

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, включают полипептид CYP82E10 и его варианты и фрагменты. Указанные полинуклеотиды и полипептиды никотиндеметираз участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, включая коммерческие сорта растений табака. В частности, композиции, предлагаемые в изобретении, включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13, выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, которые представлены в SEQ ID NO: 1, 3 и 4, и выделенные полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности, которые представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13. Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут найти применение для ингибирования экспрессии полипептидов никотиндеметираз или их вариантов, которые принимают участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, в частности, в растениях табака. Некоторые полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, имеют мутации, которые приводят к ингибированию никотиндеметиразной активности никотиндеметиразы дикого типа. Ингибирование полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, эффективно снижает уровни норникотина в линиях табака, при этом конверсия гена встречается у менее чем 30, 50, 70, 90% популяции, такой как предназначенные для сушки на пару сорта табака. Ингибирование полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, эффективно снижает уровни норникотина в популяциях растений табака, в которых конверсия гена встречается по меньшей мере у 90, 80, 70, 60, 50% популяции растений. В популяции предпочтительно присутствует более примерно 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 25000 растений, при этом более предпочтительно по меньшей мере примерно 10, 25, 50, 75, 95 или 100% растений содержат полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении.

Полинуклеотиды никотиндеметираз и кодируемые ими полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, включают новый ген цитохрома P450, обозначенный как ген CYP82E10 никотиндеметиразы, для которого впервые установлена роль в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений табака. Трансгенные подходы, такие как смысловое и антисмысловое подавление и по-

давление на основе РНКi, можно применять для частичного подавления экспрессии указанной никотиндеметилазы, таким же образом, как это описано для никотиндеметилаз CYP82E4 и CYP82E5 в публикациях заявок на патент США № 2008/0202541 A1 и № 2009/0205072 A1, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительный подход основан на интродукции одной или нескольких предпочтительных мутаций в указанный ген, поскольку преимуществом этого подхода является получение нетрансгенных растений табака, имеющих пониженные уровни превращения никотина в норникотин и в результате пониженные уровни норникотина и NNN. Указанные подходы включают (но не ограничиваясь только ими) мутагенез и т.п., как это будет описано ниже.

Изобретение относится к композициям, предлагаемым в настоящем изобретении, которые содержат выделенные или практически очищенные полинуклеотиды или белки. "Выделенный" или "очищенный" полинуклеотид или белок или их биологически активный фрагмент представляет собой субстанцию, практически или в значительной степени очищенную от компонентов, которые в норме сопутствуют или взаимодействуют с полинуклеотидом или белком в их естественном окружении. Таким образом, выделенный или очищенный полинуклеотид или белок является практически свободным от другого клеточного материала или культуральной среды при получении с помощью методов рекомбинации или практически свободным от химических предшественников или других химических соединений при получении путем химического синтеза. В оптимальном варианте "выделенный" полинуклеотид свободен от последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белок), которые в естественных условиях фланкируют полинуклеотид (т.е. последовательностей, локализованных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Например, в различных вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность длиной менее чем примерно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1 т.п.н., которая в естественных условиях фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид. Белок, практически свободный от клеточного материала, включает препараты белка, содержащие загрязняющий белок в количестве менее чем примерно 30, 20, 10, 5 или 1% (в пересчете на сухую массу). Когда белок, предлагаемый в изобретении, или его биологически активный фрагмент получают методом рекомбинации, то предпочтительно культуральная среда содержит химические предшественники или не представляющие интерес небелковые соединения в количестве, составляющем менее чем примерно 30, 20, 10, 5 или 1% (в пересчете на сухую массу).

Под объем настоящего изобретения подпадают также фрагменты описанных полинуклеотидов и кодируемых ими полипептидов. Фрагменты полинуклеотида могут кодировать белковые фрагменты, который сохраняют биологическую активность нативного белка и поэтому участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении. В альтернативном варианте фрагменты полинуклеотида, которые можно применять в качестве зондов для гибридизации или ПЦР-праймеров, как правило, не кодируют белковые фрагменты, сохраняющие биологическую активность. Кроме того, фрагменты описанных нуклеотидных последовательностей включают фрагменты, которые можно собирать в рекомбинантных конструкциях, предназначенных для "замалчивания" гена с помощью любого метода, известного в данной области, включая (но не ограничиваясь только ими) смысловое подавление/косупрессию, антисмысловое подавление, интерференцию с использованием двухцепочечной РНК (dsРНК), интерференцию с использованием шпилечной РНК и интерференцию с использованием содержащей интрон шпилечной РНК, опосредуемую ампликоном интерференцию, рибозимы и методы с использованием малых интерферирующих РНК или микроРНК, известные в данной области и описанные ниже. Таким образом, в зависимости от требуемой цели фрагменты нуклеотидной последовательности могут состоять из по меньшей мере примерно 20 нуклеотидов, примерно 50 нуклеотидов, примерно 70 нуклеотидов, примерно 100 нуклеотидов, примерно 150 нуклеотидов, примерно 200 нуклеотидов, 250 нуклеотидов, 300 нуклеотидов и иметь длину вплоть до длины полноразмерного полинуклеотида, кодирующего белки, предлагаемые в изобретении. В одном из объектов изобретения фрагменты нуклеотидной последовательности могут представлять собой фрагмент, включающий от 100 до примерно 350 нуклеотидов, от 100 до примерно 325 нуклеотидов, от 100 до примерно 300 нуклеотидов, от примерно 125 до примерно 300 нуклеотидов, от примерно 125 до примерно 275 нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 320 смежных нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 420 смежных нуклеотидов, от примерно 250 до примерно 450 смежных нуклеотидов. В другом варианте осуществления изобретения молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит от примерно 300 до примерно 450 смежных нуклеотидов.

Фрагмент полинуклеотида никотиндеметилазы, предлагаемый в настоящем изобретении, который кодирует биологически активный фрагмент полипептида CYP82E10, предлагаемого в настоящем изобретении, может кодировать по меньшей мере 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 смежных аминокислот, или вплоть до полного количества аминокислот, присутствующих в полноразмерном полипептиде никотиндеметилазы, предлагаемой в изобретении (например, 517 аминокислот в случае SEQ ID NO: 2 и 5-13). Биологически активный фрагмент полипептида никотиндеметилазы можно получать путем выделения части одного из полинуклеотидов CYP82E10, предлагаемых в настоящем изобретении, экспрессии кодируемого фрагмента полипептида CYP82E10 (например, путем рекомбинантной экспрессии *in vitro*) и оценки активности кодируемого фрагмента полипептида

CYP82E10, т.е. способности усиливать превращение никотина в норникотин, с помощью анализов, известных в данной области и представленных ниже в настоящем описании.

Полинуклеотиды, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности CYP82E10, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650 или 1700 смежных нуклеотидов, или вплоть до количества нуклеотидов, присутствующих в полноразмерном полинуклеотиде CYP82E10, представленном в настоящем описании (например, 1551 в случае SEQ ID NO: 1; 2636 в случае SEQ ID NO: 4). Полинуклеотиды, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности CYP82E10, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат фрагменты, содержащие от примерно 20 до примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 50 до примерно 1600 смежных нуклеотидов, от примерно 75 до примерно 1500 смежных нуклеотидов, от примерно 100 до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 150 до примерно 1300 смежных нуклеотидов, от примерно 150 до примерно 1200 смежных нуклеотидов, от примерно 175 до примерно 1100 смежных нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 1000 смежных нуклеотидов, от примерно 225 до примерно 900 смежных нуклеотидов, от примерно 500 до примерно 1600 смежных нуклеотидов, от примерно 775 до примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 1000 до примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 300 до примерно 800 смежных нуклеотидов из полинуклеотида CYP82E10, представленного в настоящем описании. В одном из объектов изобретения фрагменты полинуклеотидов содержат полинуклеотидную последовательность, включающую полинуклеотидную последовательность, которая начинается с нуклеотида примерно в положении 700 и простирается примерно до положения 1250 кодирующей последовательности CYP82E10, которая начинается с нуклеотида примерно в положении 700 и простирается примерно до положения 1250 геномной последовательности CYP82E10, которая начинается с нуклеотида примерно в положении 10 и простирается примерно до положения 900 интронной последовательности CYP82E10 или которая начинается с нуклеотида примерно в положении 100 и простирается примерно до положения 800 интронной последовательности CYP82E10.

Под объем настоящего изобретения подпадают также варианты описанных полинуклеотидов и кодируемых ими полипептидов. К встречающимся в естественных условиях вариантам относятся варианты, последовательности которых практически идентичны последовательностям полинуклеотидов и полипептидов CYP82E10, представленных ниже в настоящем описании. В другом варианте осуществления изобретения встречающиеся в естественных условиях варианты функционально практически идентичны полинуклеотидам CYP82E10, представленным в настоящем описании. Композиции и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для целенаправленного воздействия на экспрессию или функцию встречающегося в естественных условиях CYP82E10, последовательность которого практически идентична последовательности описанных полипептидов CYP82E10. Указанные полипептиды CYP82E10 могут обладать соответствующей никотиндеметилазной активностью, т.е. принимать участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, или не обладать указанной активностью. Такие варианты могут возникать, например, в результате генетического полиморфизма или человеческого воздействия, что имеет место при разведении и селекции, в том числе при использовании основанных на применении мутагенеза подходов. Последовательности биологически активных вариантов белка CYP82E10, предлагаемого в изобретении, например, вариантов полипептида, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13, должны быть идентичны по меньшей мере примерно на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более аминокислотной последовательности белка дикого типа при оценке с помощью программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые указаны ниже в настоящем описании, и они могут быть охарактеризованы по их функции, включающей участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, или по отсутствию указанной функции. Биологически активный вариант белка, предлагаемого в изобретении, может отличаться от белка как минимум 1-15 аминокислотными остатками, как минимум 10, как минимум 9, как минимум 8, как минимум 7, как минимум 6, как минимум 5, как минимум 4, как минимум 3, как минимум 2 или как минимум 1 аминокислотным остатком. Биологически неактивный вариант белка, предлагаемого в изобретении, может отличаться от белка как минимум 1-15 аминокислотными остатками, как минимум 10, как минимум 9, как минимум 8, как минимум 7, как минимум 6, как минимум 5, как минимум 4, как минимум 3, как минимум 2 или как минимум 1 аминокислотным остатком.

Варианты конкретного полинуклеотида, предлагаемого в настоящем изобретении, включают встречающиеся в естественных условиях полинуклеотиды, которые кодируют полипептид CYP82E10, принимающий участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений. Указанные варианты полинуклеотида могут отличаться делецией и/или добавлением одного или несколько нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде, представленном в настоящем описании, и/или заменой одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде. В результате вырожденности генетического кода консервативные варианты полинуклеотидов включают последовательности, которые кодируют аминокислотную последовательность одного из

полипептидов СYP82E10, предлагаемых в изобретении. Встречающиеся в естественных условиях варианты, такие как указанные выше, можно идентифицировать с помощью хорошо известных методов молекулярной биологии, таких, например, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методы гибридизации, хорошо известные в данной области и представленные в настоящем описании. Варианты полинуклеотидов включают также полученные синтетическим путем полинуклеотиды, например, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза, но последовательности которых все еще являются практически идентичными встречающимся в естественных условиях последовательностям, представленным в настоящем описании, и которые в результате можно применять в способах, предлагаемых в изобретении, предназначенных для ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилазы, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин, включая полипептиды никотиндеметилазы, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. Как правило, последовательности вариантов конкретного полинуклеотида, предлагаемого в изобретении, например, полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, или полинуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 и 5-13, должны быть идентичны по меньшей мере примерно на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более последовательности конкретного полинуклеотида при оценке с помощью программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые указаны ниже в настоящем описании.

Варианты конкретного полинуклеотида, предлагаемого в настоящем изобретении (обозначенного также в контексте настоящего описания как референс-полинуклеотид) можно оценивать также путем сравнения идентичности последовательности полипептида, кодируемого референс-полинуклеотидом, и полипептида, кодируемого вариантом полинуклеотида. Процент идентичности между любыми двумя полипептидами можно рассчитывать с использованием программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые описаны ниже в контексте настоящего описания. Когда любую конкретную пару полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении, оценивают путем сравнения процента идентичности последовательностей, характерного для двух кодируемых ими полипептидов, процент идентичности последовательностей двух кодируемых полипептидов составляет по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более.

Кроме того, полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, можно применять для выделения соответствующих последовательностей специфических для корня никотиндеметилаз, прежде всего последовательностей СYP82E10, из других представителей рода *Nicotiana*. ПЦР, гибридизацию и другие аналогичные методы можно применять для идентификации указанных последовательностей на основе гомологии этих последовательностей и последовательностей, представленных в настоящем описании. Под объем настоящего изобретения подпадают последовательности, выделенные на основе идентичности их последовательностей с нуклеотидными последовательностями, представленными в настоящем описании, или с их вариантами или фрагментами. Указанные последовательности включают последовательности, которые являются ортологами описанных последовательностей.

Согласно настоящему изобретению "ортологами" являются гены, выведенные из общего родového гена и которые присутствуют в различных видах в результате специализации. Гены, обнаруженные в различных видах, рассматриваются как ортологи, когда для их нуклеотидных последовательностей и/или кодируемых белковых последовательностей характерна идентичность, составляющая по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. Функции ортологов часто являются высококонсервативными в различных видах. Таким образом, под объем настоящего изобретения подпадают выделенные полинуклеотиды, которые кодируют полипептид никотиндеметилазы, участвующей в метаболическом превращении никотина в норникотин, и которые гибридизуются в строгих условиях с последовательностью СYP82E10, представленной в настоящем описании, или с ее вариантами или фрагментами. Указанные последовательности можно применять в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, ингибирования экспрессии полипептидов никотиндеметилаз, которые участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях.

С помощью ПЦР можно создавать олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для применения в ПЦР-реакциях для амплификации соответствующих последовательностей ДНК с кДНК или геномной ДНК, экстрагированной из любого представляющего интерес растения. Методы создания ПЦР-праймеров и ПЦР-клонирования, в целом, известны в данной области и описаны у Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989; в: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* под ред. Innis и др., изд-во Academic Press, New York, 1990; в: *PCR Strategies*, под ред. Innis и Gelfand, изд-во Academic Press, New York, 1995; и в: *PCR Methods Manual*, под ред. Innis и Gelfand, изд-во Academic Press, New York, 1999. Известные методы осуществления ПЦР включают (но не ограничиваясь только ими) методы, основанные на использовании пар праймеров, гнездовых праймеров, односпецифических праймеров, вырожденных праймеров, генспецифических праймеров, векторспецифических праймеров, в частности, не обеспечивающих строгое соответствие ("приблизительных") праймеров и т.п.

Методы гибридизации включают применение всего или части известного полинуклеотида в качест-

ве зонда, который избирательно гибридизуется с другими соответствующими полинуклеотидами, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т.е. библиотеки геномной ДНК или кДНК) из выбранного организма.

Гибридизацию можно осуществлять в строгих условиях. Под "строгими условиями" или "строгими условиями гибридизации" понимают условия, при которых зонд гибридизуется с его последовательностью-мишенью в значительно большей степени, чем с другими последовательностями (например, с уровнем гибридизации, превышающим фоновый уровень по меньшей мере в 2 раза). Строгие условия зависят от последовательности и должны быть разными в различных ситуациях. Контролируя строгость условий гибридизации и/или отмывки, можно идентифицировать последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). В альтернативном варианте строгие условия можно регулировать таким образом, чтобы допускать наличие нескольких мисмэтчей в последовательностях, в результате чего наблюдается более низкая степень сходства (гетерологичное зондирование). Как правило, зонд содержит менее примерно 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, строгие условия представляют собой условия, при которых концентрация соли составляет менее примерно 1,5 М в пересчете на ионы Na, как правило, концентрация составляет примерно от 0,01 до 1,0 М в пересчете на ионы Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и при температуре, составляющей по меньшей мере примерно 30°C. Для достижения строгих условий можно также добавлять дестабилизирующие агенты, такие как формамид. Примером гибридизации в условиях пониженной строгости является гибридизация с использованием буферного раствора, содержащего от 30 до 35% формамида, 1 М NaCl, 1% ДСН (додецилсульфат натрия), при 37°C и отмывки в 1-2× SSC (20× SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М тринатрийцитрат) при 50-55°C. Примером гибридизации в условиях умеренной строгости является гибридизация с использованием от 40 до 45% формамида, 1,0 М NaCl, 1% ДСН при 37°C и отмывки в 0,5-1× SSC при 50-60°C. Примером гибридизации в строгих условиях является гибридизация с использованием 5% формамида, 1 М NaCl, 1% ДСН при 37°C и отмывки в 0,1× SSC при 60-65°C. Необязательно буфер для отмывки может содержать от примерно 0,1% до примерно 1% ДСН. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем примерно 24 ч, как правило, от примерно 4 до примерно 12 ч. Продолжительность отмывки должна быть по меньшей мере достаточной для достижения равновесия.

В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридизация в строгих условиях представляет собой гибридизацию в растворе, содержащем 5×SSC, 0,5% ДСН, 5× раствор Денхарда, 0,45 мкг/мл полиА-РНК, 0,45 мкг/мл ДНК тимуса теленка и 50% формамида, при 42°C и с использованием по меньшей мере одной отмывки после гибридизации в растворе, содержащем от примерно 0,01× SSC до примерно 1× SSC. Продолжительность гибридизации составляет от примерно 14 до примерно 16 ч.

Специфичность, как правило, зависит от условий отмывок после гибридизации, при этом имеющими решающее значение факторами являются ионная сила и температура конечного отмывочного раствора. Для гибридов типа ДНК-ДНК $t_{пл}$ можно аппроксимировать из уравнения, указанного у Meinkoth и Wahl, Anal. Biochem. 138, 1984, с. 267-284: $t_{пл} = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{form}) - 500/L$; в котором M обозначает молярность одновалентных катионов, %GC обозначает процентное содержание гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК, % form обозначает процентное содержание формамида в растворе для гибридизации и L обозначает длину гибрида в парах оснований. $t_{пл}$ представляет собой температуру (при определенной ионной силе и значении pH), при которой 50% комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с точно соответствующим зондом. $t_{пл}$ снижается примерно на 1°C при наличии каждого 1% мисмэтчей; таким образом, $t_{пл}$, условия гибридизации и/или отмывки можно регулировать для гибридизации с последовательностями требуемой идентичности. Например, если требуются последовательности с идентичностью >90%, то $t_{пл}$ можно снизить на 10°C. Как правило, строгие условия выбирают, используя температуру примерно на 5°C ниже, чем термическая точка плавления ($t_{пл}$) конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и значении pH. Однако при применении строгих условий гибридизацию и/или отмывку можно осуществлять при температуре, которая на 1, 2, 3 или 4°C ниже термической точки плавления ($t_{пл}$); при применении умеренных условий гибридизацию и/или отмывку можно осуществлять при температуре, которая на 6, 7, 8, 9 или 4°C ниже термической точки плавления ($t_{пл}$); при применении расслабленных условий гибридизацию и/или отмывку можно осуществлять при температуре, которая на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже термической точки плавления ($t_{пл}$). Обычному специалисту в данной области должно быть очевидно, что при использовании указанного уравнения, составов для гибридизации и отмывки и требуемой $t_{пл}$, можно изменять строгость растворов для гибридизации и/или отмывки. Если допустимый уровень мисмэтчей приводит к тому, что $t_{пл}$ составляет менее 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), то предпочтительно повышать концентрацию SSC для того, чтобы применять более высокую температуру. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот представлено у Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, часть I, глава 2, изд-во Elsevier, New York, 1993; и в Current Protocols in Molecular Biology, под ред. Ausubel и др., глава 2,

изд-во Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995 (см. Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989).

Применяемые для гибридизации зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, кДНК-фрагменты, РНК-фрагменты или другие олигонуклеотиды и могут быть мечены выявляемой группой, такой как ^{32}P или другой выявляемый маркер. Например, зонды для гибридизации можно создавать путем мечения синтетических олигонуклеотидов, основной которых являются полинуклеотидные последовательности CYP82E10, предлагаемые в настоящем изобретении. Методы получения зондов для гибридизации и конструирования библиотек кДНК и геномных ДНК, в целом, известны в данной области и описаны у Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989.

Например, полинуклеотидные последовательности CYP82E10, представленные в настоящем описании, или одну или несколько их частей можно использовать в качестве зондов, которые могут специфически гибридизоваться с соответствующими полинуклеотидами специфических для корня никотиндеметилаза и матричными РНК. Для достижения специфической гибридизации в различных условиях указанные зонды включают последовательности, которые являются уникальными для полинуклеотидных последовательностей CYP82E10 или являются уникальными для одной из полинуклеотидных последовательностей CYP82E10, включая расположенные против хода транскрипции относительно кодирующей последовательности 5'-области и расположенные по ходу транскрипции относительно кодирующей последовательности 3'-области и интронную область (например, SEQ ID NO: 3), и предпочтительно содержат по меньшей мере примерно 10 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 20 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 50 смежных нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 75 смежных нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 100 смежных нуклеотидов. Указанные зонды можно применять для амплификации соответствующих полинуклеотидов CYP82E10. Этот метод можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей или мутаций из требуемого растения или в качестве диагностического анализа, позволяющего определять присутствие кодирующих последовательностей в растении. Метод гибридизации включает гибридизационный скрининг высевных ДНК-библиотек (либо бляшек, либо колоний; см., например, Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989).

В контексте настоящего описания касательно взаимосвязей между двумя или большим количеством полинуклеотидов или полипептидов понятие "референс-последовательность" относится к основе, применяемой для сравнения последовательностей. Референс-последовательность можно представлять собой частично или полностью специфическую последовательность; например, сегмент полноразмерной последовательности кДНК или последовательности гена, или полную последовательность кДНК или последовательность гена.

В контексте настоящего описания понятие "окно сравнения" относится к состоящему из смежных нуклеотидов конкретному сегменту полинуклеотидной последовательности, при этом находящаяся в окне сравнения полинуклеотидная последовательность может нести добавления или делеции (т.е. "бреши") по сравнению с референс-последовательностью (в которой отсутствуют добавления или делеции), применяемые для оптимального выравнивания двух полинуклеотидов. Как правило, окно сравнения содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов и необязательно может содержать 30, 40, 50, 100 или большее количество нуклеотидов. Специалистам в данной области известно, что для избежания высокого уровня сходства с референс-последовательностью, достигаемого за счет включения брешей в полинуклеотидную последовательность, как правило, вводят штраф за брешь и вычитают его из количества совпадений.

Методы выравнивания последовательностей с целью их сравнения хорошо известны в данной области. Так, для определения процента идентичности последовательностей любых двух последовательностей можно применять математический алгоритм. Примерами таких математических алгоритмов являются (но не ограничиваясь только ими) алгоритм, описанный у Myers и Miller, *CABIOS* 4, 1988, с. 11-17; алгоритм локального выравнивания, описанный у Smith и др., *Adv. Appl. Math.* 2, 1981, с. 482; алгоритм глобального выравнивания, описанный у Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 1970, с. 443-453; метод выравнивания, основанный на локальном поиске, описанный у Pearson и Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1988, с. 2444-2448; алгоритм, описанный у Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1990, с. 2264, модифицированный согласно Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, с. 5873-5877.

Программы BLAST, описанные у Altschul и др., *J. Mol. Biol.* 215, 1990, с. 403, основаны на алгоритме Karlin и Altschul, 1990, выше. Исследование нуклеотидных последовательностей с использованием программ BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTN, в которой балл=100, длина слова=12, определяя тем самым нуклеотидные последовательности, гомологичные с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует белок, предлагаемый в изобретении. Исследование белков с использованием программ BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTX, в которой балл=50, длина слова=3, определяя тем самым аминокислотные последовательности, гомологичные белку или полипептиду, предлагаемому в изобретении. Для выравнивания включающих брешы последовательности-

стей с целью сравнения можно примерять программу Gapped BLAST (входящую в пакет программ BLAST 2.0), которая описана у Altschul и др., *Nucleic Acids Res.* 25, 1997, с. 3389. В альтернативном варианте для осуществления итерационного поиска можно применять программу PSI-BLAST (входящую в пакет программ BLAST 2.0), которая позволяет определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (см. Altschul и др., 1997, выше). При применении BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можно использовать задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, BLASTN для нуклеотидных последовательностей, BLASTX для белков) (см. www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание можно осуществлять вручную на основе визуальной оценки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни идентичности/сходства последовательностей, указанные в настоящем описании, рассчитывали с использованием алгоритмов BLASTX (Altschul и др., 1997, выше), Clustal W (Higgins и др., *Nucleic Acids Res.* 22, 1994, с. 4673-4680) и GAP (входит в пакет программ, разработанных группой вычислительной генетики Висконсинского университета (University of Wisconsin Genetic Computing Group)) с использованием задаваемых по умолчанию параметров. Под объем настоящего изобретения подпадает также применение эквивалентной программы для анализа и сравнения нуклеотидных и белковых последовательностей. Под "эквивалентной программой" подразумевают любую программу, предназначенную для анализа последовательностей, которая позволяет для любых двух рассматриваемых последовательностей осуществлять выравнивание, включающее соответствие идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков, и дает такой же процент идентичности последовательностей, что и полученный при соответствующем выравнивании с помощью программ BLASTX, Clustal W или GAP.

Для целей приведенного ниже обсуждения вариантов нуклеотидных и полипептидных последовательностей, подпадающих под объем настоящего изобретения, понятие "идентичность последовательностей" или "идентичность" в контексте двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в конкретном окне сравнения. Когда процент идентичности последовательностей применяют касательно белков, то принимают, что положения неидентичных остатков часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, при которых аминокислотный остаток заменен на другие аминокислотные остатки со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность) и поэтому не происходит изменения функциональных свойств молекулы. Когда последовательности отличаются консервативными заменами, то процент идентичности последовательностей можно повышать для корректировки с учетом консервативной природы замены. Говорят, что последовательности, которые отличаются консервативными заменами, обладают "сходством последовательностей" или "сходством". Пути осуществления такой корректировки, хорошо известны специалистам в данной области. Как правило, они заключаются в том, что при назначении балльной оценки консервативную замену рассматривают как частичный, а не полный мисмэтч, что повышает процент идентичности последовательностей. Так, например, если идентичность аминокислот характеризуется баллом 1, а неконсервативная замена характеризуется баллом ноль, то консервативная замена характеризуется баллом, находящейся между 0 и 1. Для расчета баллов, которые присваиваются консервативным заменам, например, используют программу PC/GENE (фирма Intelligenetics, Маунтин-Вью, шт. Калифорния).

В контексте настоящего описания "процент идентичности последовательностей" означает величину, которую определяют путем сравнения двух оптимальным образом выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может нести добавления или делеции (т.е. бреши) по сравнению с референс-последовательностью (в которой отсутствуют добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают, определяя количество положений, в которых находятся идентичные нуклеотидные основания или аминокислотные остатки в обеих последовательностях, устанавливая количество соответствующих положений, осуществляя деление количества соответствующих положений на общее количество положений в окне сравнения, и умножая результат на 100, получая тем самым процент идентичности последовательностей.

Так, полинуклеотидные и полипептидные последовательности CYP82E10 можно идентифицировать с использованием последовательностей, которые представлены в настоящем описании. Такие методы заключаются в том, что получают полинуклеотидную или полипептидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99% полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 3 или 4, или ее комплементу или фрагменту, или идентична полипептидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 или 5-13. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид, соответствующий SEQ ID NO: 2, имеет серин в положении 79, 107 или 381 полипептида CYP82E10, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

Способы ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилазы

Предложены способы снижения концентрации, содержания и/или активности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, в растениях или частях растений *Nicotiana*, в частности, в корневой ткани. Целый ряд способов можно использовать индивидуально или в сочетании для снижения или элиминации активности полипептида CYP82E10 (SEQ ID NO: 2), предлагаемого в настоящем изобретении, и

его вариантов, которые сохраняют активность никотиндеметилаз (например, SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10). Кроме того комбинации способов можно применять для снижения или элиминации активности двух или большего количества различных никотиндеметилаз, более конкретно, специфической для корня никотиндеметилазы СУР82Е10 и одной или обеих никотиндеметилаз, таких как специфическая для зеленых листьев никотиндеметилаза СУР82Е5 и индуцируемая старением никотиндеметилаза СУР82Е4. В конкретном варианте осуществления изобретения СУР82Е5 представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере одну мутацию аминокислоты в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, которая оказывает отрицательное воздействие на превращение в зеленых листьях, и СУР82Е4 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, которая содержит по меньшей мере одну мутация аминокислоты, оказывающую отрицательное воздействие на превращение в стареющих листьях.

Согласно настоящему изобретению считается, что имеет место ингибирование экспрессии никотиндеметилазы СУР82Е10, предлагаемой в настоящем изобретении, если уровень белка, представляющего собой полипептид СУР82Е10, статистически ниже уровня белка, представляющего собой этот же полипептид СУР82Е10, в растении, которое не является генетически модифицированным или измененным с помощью мутаций, что приводит к ингибированию экспрессии указанного полипептида СУР82Е10, и при этом указанные растения культивировали и собирали их урожай с использованием таких же протоколов. В конкретных вариантах осуществления изобретения уровень белка, представляющего собой полипептид СУР82Е10, в модифицированном растении, предлагаемом в изобретении, ниже на 95%, ниже на 90%, ниже на 80%, ниже на 70%, ниже на 60%, ниже на 50%, ниже на 40%, ниже на 30%, ниже на 20%, ниже на 10% или ниже на 5% уровня белка, представляющего собой такой же полипептид СУР82Е10, в растении, которое не является мутантным или генетически модифицированным, что приводит к ингибированию полипептида СУР82Е10, и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких же протоколов. Уровень экспрессии полипептида СУР82Е10 можно измерять непосредственно, например, оценивая уровень транскрипта СУР82Е10 или полипептида СУР82Е10, экспрессируемого в растении или части растения табака, или косвенно, например, измеряя уровень превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Методы мониторинга уровня экспрессии белка известны в данной области и включают (но не ограничиваясь только ими) анализ методом Нозерн-блоттинга и анализ дифференцировки РНК. Методы определения активности целевого полипептида СУР82Е10 в отношении превращения никотина в норникотин известны в данной области и представлены ниже в настоящем описании, и они включают (но не ограничиваясь только ими) анализ алкалоидов с помощью газовой хроматографии.

В настоящем изобретении предложены способы снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилаз, где мутация снижает экспрессию гена никотиндеметилазы и где первый из указанных генов никотиндеметилаз кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или части растения табака. В некоторых вариантах осуществления изобретения специфическая для корня никотиндеметилаза представляет собой СУР82Е10 или ее вариант. В других вариантах осуществления изобретения указанные способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который кодирует СУР82Е10 или ее вариант, и мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который кодирует СУР82Е4 или ее вариант, и/или гена никотиндеметилазы, который кодирует СУР82Е5 или ее вариант.

Для объединения мутаций в одном растении использовали ряд подходов, в том числе половое скрещивание. Растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене СУР82Е10, которая ингибирует активность никотиндеметилаз в корнях, можно скрещивать с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене СУР82Е4v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, или скрещивать с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене СУР83Е5v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях, с получением растения, которое обладает пониженным уровнем превращения никотина в норникотин. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения скрещивания осуществляют для интродукции предпочтительной мутации в ген СУР82Е10, СУР82Е4v2 и СУР82Е5v2 в одном и том же растении. Таким образом, растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене СУР82Е10, которая ингибирует активность никотиндеметилаз в корнях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене СУР82Е4v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, и предпочтительную мутацию в гене СУР83Е5v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях. В альтернативном варианте растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене СУР82Е4v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене СУР82Е10, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в корнях, и предпочтительную мутацию в гене СУР83Е5v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях. В следующем варианте осуществления изобретения растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене СУР82Е5v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых ли-

стях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене CYP82E10, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в корнях, и предпочтительную мутацию в гене CYP83E4v2, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях. Путем интродукции предпочтительной мутации в каждый из указанных генов никотиндеметилаз можно получать растение, имеющее пониженные уровни превращения никотина в норникотин, при этом уровни превращения не превышают примерно 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7%.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения растение, имеющее одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида CYP82E10 в положении 79, 107, 381 или 419 (где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2), можно скрещивать с растением, имеющим одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида CYP82E4 в положении 329, 364, 376, 381 или 458, и/или имеющим одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида CYP82E5 в положении 422 или 449, с получением растения, в котором уровни превращения не превышают примерно 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7%. Наиболее предпочтительный уровень превращения никотина в норникотин может составлять от 0,05 до 0,4%, от 0,1 до 0,6%, от 0,1 до 0,3%, от 0,1 до 0,5%, от 0,1 до 0,4%, от 0,1 до 0,7%, от 0,1 до 1,0%, от 0,1 до 1,1%, от 0,1 до 1,2%, от 0,1 до 1,3%, от 0,1 до 1,4% или от 0,1 до 1,5%. Любая мутация в полинуклеотиде, предлагаемом в настоящем изобретении, которая приводит к укорочению полипептида CYP82E10, CYP83E4 или CYP83E5 перед консервативным связывающим гем мотивом должна ингибировать фермент и ее можно применять в указанном выше скрещивании. Домены белков цитохрома P450 известны в данной области (см., например, Xu и др., *Physiologia Plantarum* 129, 2007, с. 307-319, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки). Путем скрещивания растений с нефункциональным или заингибированным геном CYP82E10, с растениями с нефункциональным или заингибированным геном CYP82E4v2, с нефункциональным или заингибированным геном CYP82E5v2 или с нефункциональными или заингибированными генами CYP82E4v2 и CYP82E5v2 можно получать растение табака с пониженными уровнями норникотина.

Активность полипептида никотиндеметилазы CYP82E10, CYP82E4 или CYP82E5 в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака является заингибированной согласно настоящему изобретению, если активность в отношении указанного превращения статистически ниже, чем активность в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы в растении или части растения табака, которое не подвергалось генетической модификации для ингибирования активности в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких же протоколов. В конкретных вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в модифицированном растении или части растения табака, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, является заингибированной, если активность составляет менее 95%, менее 90%, менее 80% менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 2% или менее 1% от активности в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы в растении табака, которое не подвергалось генетической модификации для ингибирования экспрессии полипептида такой же никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких же протоколов. Активность полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака является элиминированной согласно изобретению, когда она находится ниже предела обнаружения с помощью методов, представленных в настоящем описании. Методы определения активности полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении табака с использованием газовой хроматографии представлены ниже в примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительную мутацию интродуцируют в растение или часть растения табака с помощью мутагенеза и интродуцированную мутацию выбирают с помощью методов, известных специалистам в данной области, таких как (но не ограничиваясь только ими) анализ методом Саузерн-блоттинга, секвенирование ДНК, анализ на основе ПЦР или фенотипический анализ. Растение или часть растения, измененного или модифицированного согласно указанным выше вариантам осуществления изобретения, выращивают в условиях, в которых происходит образование растения, в течение периода времени, достаточного для модуляции концентрации и/или активности полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, в растении. Условия, в которых происходит образование растения, хорошо известны в данной области и кратко указаны ниже в настоящем описании.

Модифицированное растение табака, содержащее предпочтительную мутацию в никотиндеметилазе, представленную в настоящем описании, отличается пониженным уровнем превращения никотина в норникотин. В конкретных вариантах осуществления изобретения уровень превращения никотина в норникотин в модифицированном растении или части растения табака, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, составляет менее 95%, менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 2% или менее 1% от уровня превращения в растении табака, которое не подвергалось генетической модификации для ингибирования экспрессии полипептида такой же никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких

же протоколов. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное растение табака представляет растение табака, являющееся конвертером. В других вариантах осуществления изобретения модифицированное растение табака представляет собой растение табака, не являющееся конвертером. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное растение табака отличается более низким уровнем превращения по сравнению с уровнем, обнаруженным в коммерческих растениях табака, которые не являются конвертерами.

Согласно настоящему изобретению изменения в уровнях, соотношениях, активности или распределении полипептидов CYP82E10, предлагаемых в настоящем изобретении, или изменения фенотипа растения или части растения табака, прежде всего снижение накопления норникотина и его онкогенного метаболита NNN можно измерять, сравнивая анализируемое растение или часть растения с контрольным растением или частью растения, где анализируемое растение или часть растения и контрольное растение или часть растения культивировали и/или собирали их урожай с использованием таких же протоколов. В контексте настоящего описания анализируемое растение или часть растения представляет собой растение или часть растения, в котором генетическое изменение, например, полученное с помощью мутагенеза, влияет на представляющий интерес полипептид никотиндеметилазы или представляет собой растение или часть растения табака, являющееся потомком растения или части растения табака, измененного таким образом и содержащего указанную модификацию. Контрольное растение или часть растения представляет собой стандарт для оценки изменений фенотипа анализируемого растения или части растения. Оценку изменений фенотипа растения или части растения можно осуществлять в любой момент времени, в том числе в процессе развития, старения растения или после сушки. В других вариантах осуществления изобретения оценку изменений фенотипа можно осуществлять в растениях, выращенных в каких-либо других условиях, в том числе в растениях, выращенных в вегетационной камере, теплице или в поле. В одном из вариантов осуществления изобретения оценку изменения фенотипа можно осуществлять путем определения уровня превращения никотина в норникотин. В предпочтительном варианте осуществления изобретения уровень превращения можно оценивать путем деления процентного содержания норникотина (в виде процента относительно общей массы ткани) на сумму процентного содержания никотина и норникотина (в виде процента относительно общей массы ткани) и умножения на 100.

Согласно настоящему изобретению контрольное растение или часть растения может представлять собой растение или часть растения табака дикого типа, т.е. такого же генотипа, что и исходный материал для генетического изменения, приводящего к получению анализируемого растения или части растения. Контрольное растение или часть растения может представлять собой также растение или часть растения табака такого же генотипа, что и исходный материал, но быть трансформированным "нулевой" конструкцией (т.е. конструкцией, для которой отсутствуют данные о воздействии на представляющий интерес признак, например, конструкцией, которая содержит селективируемый маркерный ген). Во всех случаях анализируемое растение или часть растения и контрольное растение или часть растения культивируют и собирают их урожай с использованием таких же протоколов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении, можно снижать или элиминировать, нарушая ген, который кодирует полипептид никотиндеметилазы. Изобретение относится к подвергнутым мутагенезу растениям, которые несут мутации в генах никотиндеметилазы, где мутации приводят к снижению экспрессии гена никотиндеметилазы или ингибированию активности кодируемого полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении.

В других вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении, снижают или элиминируют путем нарушения гена, который кодирует полипептид никотиндеметилазы. Ген, который кодирует полипептид никотиндеметилазы можно нарушать с помощью любого метода, известного в данной области, например, транспозонного мечения или мутагенеза растений посредством неспецифического или направленного мутагенеза, и отбора растений с пониженным уровнем никотиндеметилазной активности или с мутациями только в CYP82E10 или в сочетании с мутациями в CYP82E4 или CYP82E5.

Транспозонное мечение можно применять для снижения или элиминации активности одного или нескольких полипептидов никотиндеметилаз CYP82E10, предлагаемых в изобретении. Транспозонное мечение предусматривает встраивание транспозона в эндогенный ген никотиндеметилазы для снижения или элиминации экспрессии полипептида никотиндеметилазы.

Методы транспозонного мечения конкретных генов в растениях хорошо известны в данной области (см., например, Maes и др., *Trends Plant Sci* 4, 1999, с. 90-96; Dharmapuri и Sonti, *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 1999, с. 53-59; Meissner и др., *Plant J.* 22, 2000, с. 265-274; Phogat и др., *J. Biosci.* 25, 2000, с. 57-63; Walbot, *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 2000, с. 103-107; Gai и др., *Nucleic Acids Res.* 28, 2000, с. 94-96; Fitzmaurice и др., *Genetics* 153, 1999, с. 1919-1928).

В данной области известны также и другие методы снижения или элиминации экспрессии эндогенных генов в растениях и их также можно применять согласно настоящему изобретению. Указанные методы включают другие формы мутагенеза с использованием мутагенных или онкогенных соединений, например, индуцированный этилметансульфонатом (ЭМС) мутагенез, делеционный мутагенез и делеци-

онный мутагенез с использованием быстрых нейтронов, применяемый для "обратной генетики" (с использованием ПЦР) для идентификации линий растений, в которых удален путем делеции эндогенный ген. Примеры указанных методов представлены у Ohshima и др., *Virology* 213, 1998, с. 472-481; Okubara и др., *Genetics* 137, 1994, с. 867-874 и у Quesada и др., *Genetics* 154, 2000, с. 421-4315; каждая из публикаций включена в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, согласно изобретению можно применять также быстрый и автоматизированный метод скрининга индуцируемых химическими соединениями мутаций, TILLING (введение индуцированных локальных повреждений в геном (Targeting Induced Local Lesions In Genomes), методы с применением денатурирующей ЖХВР или избирательного эндонуклеазного расщепления отобранных ПЦР-продуктов (см. McCallum и др., *Nat. Biotechnol.* 18, 2000, с. 455-457, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Мутации, которые нарушают экспрессию гена или оказывают воздействие на функцию кодируемого белка никотиндеметилазы, можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Инсерционные мутации в экзонах гена, как правило, приводят к получению нуль-мутантов. Мутации в консервативных остатках могут оказаться особенно эффективными в отношении ингибирования метаболической функции кодируемого белка. Описаны консервативные остатки полипептидов растительных никотиндеметилаз, пригодные для мутагенеза с целью элиминации активности полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака (см. фиг. 1А-В опубликованной заявки на патент США № 2009/0205072 А1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки, где остатки, отличающиеся от других полипептидов Р450, выделены серым цветом). Консервативный остаток представляет собой остаток в каждом положении, который не выделен серым цветом. Указанные мутанты можно выделять согласно процедурам, хорошо известным в данной области.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения можно применять доминантные мутации для обеспечения молчания РНК посредством инверсии гена и рекомбинации содержащего два аллеля локуса гена (см. например, Kusaba и др., *Plant Cell* 15, 2003, с. 1455-1467).

Согласно другому варианту осуществления изобретения композиции, предлагаемые в изобретении, находят применение в методах скрининга для идентификации растений, не являющихся конвертерами, которые предназначены для применения в программах селекции. Для этого можно применять нуклеотидные последовательности, предлагаемые в изобретении, для скрининга нативной зародышевой плазмы растений, не являющихся конвертерами, которые имеют стабильную мутацию в гене СУР82Е10, идентифицированную согласно настоящему описанию. Указанные растения, не являющиеся конвертерами, идентифицированные с помощью способов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять для создания чистых линий.

Помимо нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептиды СУР82Е10, представленные в настоящем описании, композиции, предлагаемые в изобретении, включают интронную последовательность в последовательности гена СУР82Е10, которую можно применять в методах скрининга. Не вдаваясь в какой-либо механизм действия, можно считать, что ген(ы) СУР82Е10 может(гут) являться только представителем(ями) семейства цитохрома Р450, участвующего в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях табака. Для ряда вариантов применения может оказаться полезным иметь средства для диагностической дифференциации указанного конкретного представителя семейства генов цитохрома Р450 от остальных близкородственных последовательностей в этой семье. Например, возможно, что во встречающейся в естественных условиях зародышевой плазме табака (или в подвергнутых мутагенезу популяциях) могут существовать дополнительные варианты, в которых этот ген в естественных условиях имеет нарушенную функцию и поэтому может являться ценным в качестве перманентного источника неконвертеров. Указанные последовательности с нарушенной функцией могут представлять собой последовательности, которые кодируют полипептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11, 12 или 13. Метод специфического анализа указанных генотипов (например, делеционных мутантов, реаранжировок и т.п.) может служить в качестве эффективного инструмента. В настоящем изобретении описаны праймеры, созданные для специфической амплификации экзона 1 и экзона 2 СУР82Е10, при этом одна из двух пар праймеров соответствует интрону, расположенному между экзонами. Примеры праймеров, которые можно применять для амплификации экзонов СУР82Е10, имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 35 плюс SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37 плюс SEQ ID NO: 38. Эти же праймеры можно применять для анализа последовательностей продуктов.

Поскольку интронные области генов, как правило, являются менее консервативными по сравнению с экзонами, можно предположить, что применение специфического для интрона зонда должно с большей эффективностью отличать ген(ы), соответствующие гену СУР82Е10, от других представителей семейства СУР82Е. Применение специфического для интрона СУР82Е10 зонда и/или ПЦР-праймеров, используемых для создания продуктов, представляет собой эффективные инструменты в анализах, предназначенных для решения вопроса о том, несут ли любые встречающиеся в естественных условиях или подвергнутые мутагенезу растения табака делеции или реаранжировки, которые делают ген неактивным. Указанное растение можно затем применять в программах селекции для создания линий табака, в которых не может происходить указанное превращение.

Растения, части растений табака и изделия с пониженным содержанием норникотина и NNN

Полинуклеотиды СYP82E10, предлагаемые в изобретении, и их варианты и фрагменты можно применять в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, для ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилазы СYP82E10, которые участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении. Таким образом, предпочтительные мутации можно интродуцировать в представляющий интерес ген СYP82E10. Способы, предлагаемые в изобретении, не зависят от конкретного метода интродукции предпочтительной мутации в ген СYP82E10 никотиндеметилазы.

Композиции и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для снижения содержания норникотина, в частности в листьях и стеблях любого растения рода *Nicotiana*, включая (но не ограничиваясь только ими) следующие виды: *acuminata*, *affinis*, *alata*, *attenuate*, *bigelovii*, *clevelandii*, *excelsior*, *forgetiana*, *giauca*, *glutinosa*, *langsdorffii*, *longiflora*, *obtusifolia*, *palmeri*, *paniculata*, *plumbaginifolia*, *quadrivalvis*, *repanda*, *rustica*, *suaveolens*, *sylvestris*, *tabacum*, *tomentosa*, *trigonophylla* и *x sanderae*. Настоящее изобретение можно также воплощать на практике с использованием любых сортов растения рода *Nicotiana*, включая (но не ограничиваясь только ими) *Nicotiana acuminata multiflora*, *Nicotiana alata grandiflora*, *Nicotiana bigelovii quadrivalvis*, *Nicotiana bigelovii wallacei*, *Nicotiana obtusifolia obtusifolia*, *Nicotiana obtusifolia palmeri*, *Nicotiana quadrivalvis bigelovii*, *Nicotiana quadrivalvis quadrivalvis*, *Nicotiana quadrivalvis wallacei* и *Nicotiana trigonophylla palmeri*, а также различных известных сортов, известных как сорта, подвергаемые сушке на пару, или светлые сорта, сорта табака Бёрли, темные сорта и восточные/турецкие сорта. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющее интерес растение табака представляет собой растение сорта Бёрли, Вирджиния, растение, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта восточный или растение, из которого получают темный сорт табака.

Растения табака и сорта, представленные в настоящем описании, можно применять для выращивания и сбора урожая с помощью общепринятых методов, таких как культивирование в богатых перегноем почвах или без перегноя, с помещением цветков в мешки или без указанной защиты или с укорачиванием верхушек или без укорачивания. Собранные листья и стебли можно применять в любых традиционных табачных изделиях, включая (но не ограничиваясь только ими) трубочный, сигарный и сигаретный табак и жевательный табак в любой форме, в том числе листовой табак, раскрошенный табак или нарезанный табак.

Таким образом, настоящее изобретение относится к растению или части растения табака, содержащего/содержащей мутации в гене, который кодирует никотиндеметилазу СYP82E10, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы СYP82E10 и к уменьшенному количеству норникотина и N'-нитрозонорникотина. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "уменьшенное количество" или "пониженный уровень" относятся к количеству норникотина и/или N'-нитрозонорникотина в растении, предлагаемом в настоящем изобретении, или части растения табака или табачном изделии, более низкому по сравнению с обнаруженным в растении рода *Nicotiana* или части растения или табачном изделии из такого же сорта табака, обработанного (т.е. культивированного и собранного) таким же образом, но которое не было генетически модифицировано с целью снижения уровня норникотина и/или N'-нитрозонорникотина. Количество норникотина может быть снижено от примерно на 10% до более чем примерно на 90%, в том числе более чем примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70% и примерно на 80%. Превращение никотина в норникотин может составлять менее 0,3%, менее 0,5%, менее 0,7%, менее 0,1-0,5%, от 0,1 до 0,4%, от 0,1 до 0,7% или от 0,1 до 1,0% в растениях, частях растений и продуктах, предлагаемых в настоящем изобретении, и более конкретно в растениях, частях растений, имеющих мутации в СYP82E10, СYP82E4v2 и СYP825v2.

Понятие "табачные изделия" в контексте настоящего описания относится (но не ограничиваясь только ими) к продуктам, предназначенным для курения (например, любые сигареты, включая сигариллы (сигара в табачном листе), сигареты с невентилируемым фильтром или сигареты с вентилируемым рецесс-фильтром, сигары, трубочный табак), продукты, не пригодные для курения (например, нюхательный табак, жевательный табак, биоразложимые вставки (например, гумми, лепешки, растворимые полоски)) (см., например, US 2005/0019448, который включен в настоящее описание в качестве ссылки). Настоящее изобретение относится также к смесевым табачным изделиям, которые можно получать, объединяя обычный табак с различными количествами табака с низким уровнем норникотина и/или N'-нитрозонорникотина, представленного в настоящем описании. В других вариантах осуществления изобретения растение или часть растения рода *Nicotiana*, описанное/описанная выше, представляет собой высушенный табак.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения табачное изделие характеризуется пониженным онкогенным потенциалом дыма табака, который непосредственно вдыхается при использовании табачного изделия (такого как сигары, сигареты или трубочный табак) или вдыхается в виде вторичного табачного дыма (т.е. в том случае, когда индивидуум вдыхает табачный дым, который образуется при курении другим индивидуумом табачного изделия, такого как сигары, сигареты или трубочный табак). Высушенный табак, представленный в настоящем описании, можно применять для изготовления табачного изделия, прежде всего изделия, которое подвергнуто химическим изменениям в результате

нагревания, которое содержит уменьшенное количество норникотина и/или N'-нитрозонорникотина в струе дыма, который вдыхают непосредственно или вдыхают в виде вторичного дыма. Аналогично этому табачные изделия, предлагаемые в изобретении, можно применять для изготовления бездымных табачных изделий, таких как жевательный табак, нюхательный табак и т.п.

Таким образом, табачные изделия, изготовленные из растений табака, предлагаемых в настоящем изобретении, находят применение в способах снижения онкогенного потенциала указанных табачных изделий и снижения воздействия на людей онкогенного нитрозамина NNN, прежде всего на индивидуумов, которые употребляют табачные изделия. Представленные ниже примеры служат для иллюстрации изобретения и не направлены на ограничение его объема.

Экспериментальный раздел

Ссылки, процитированные в представленном ниже разделе, приведены сразу после "Экспериментального раздела".

Известный уровень техники

Данные о том, что CYP82E4v2 представляет собой локус никотиндеметилазы, ответственной для высокого уровня накопления норникотина в растениях-конвертерах (Siminszky и др., 2005), открыли путь к нетрансгенным, а также трансгенным подходам, которые позволяют решать проблему, связанную с превращением, и снижать содержание норникотина в состарившихся высушенных листьях. В частности, это позволяет исследователям создавать популяции табака, обработанные химическим мутагеном, и отбирать особи, которые несут нефункциональные аллели в локусе CYP82E4v2. Действительно, на основе указанной стратегии три независимые группы исследователей уже создали линии табака, в которых не происходит превращение (Dewey и др., 2007; Xu и др., 2007; Julio и др., 2008).

Как указано ранее, растение табака, обозначенное 775, идентифицировали в популяции линии сорта Бёрли DN98-325-6, для обработки которой в качестве мутагена применяли ЭМС, и у этого растения обнаружена вызывающая "выключение" мутация в гене CYP82E4v2 (Dewey и др., 2007). Осенью 2008 г. растения, гомозиготные по мутации 775, выращивали на исследовательской станции Upper Coastal Plains в г. Роки-Маунт, шт. Северная Каролина и подвергали воздушной сушке согласно стандартной промышленной практике. Анализ алкалоидов в этом материале осуществляли согласно "LC Protocol" ("протокол ЖХ"), описанного у Jack и др., 2007. Как видно из табл. 1, у растений, несущих мутацию 775, средний уровень превращения никотина в норникотин составлял 2,6%. В отличие от этого у родительской линии DN98-325-6, которая имела сильный конвертерный генотип, был обнаружен уровень превращения, составлявший >60%. Практически идентичные результаты опубликованы Julio и др., 2008, было установлено, что для растений, гомозиготных по вызывающей "выключение" мутации *cyp82e4v2*, у линии сорта Бёрли с сильным конвертерным генотипом BB16NN (уровень превращения у родительской линии составлял от 68 до 98%) процент превращения составлял от 2,82 до 3,37. Таким образом, ослабляющие мутации, введенные только в ген CYP82E4v2, вероятно, являются эффективными в отношении устранения проблем, связанных с нестабильным генетическим феноменом, который ассоциирован с поколением растений-конвертеров.

Таблица 1

Профили алкалоидов в экспериментальном материале, которые оценивали в полевом опыте в 2008 г. Величины, выраженные в процентах, представляют собой средние значения

Генотип	Ген-мишень	Мутация ^б	Аминокислотная замена	Содержание никотина ^а (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения ^г
DN98-325-6 контроль (15) ^а	контроль	-	-	1,228	2,014	0,016	0,125	62,5
TN90LC (14)	контроль	-	-	4,680	0,157	0,022	0,155	3,2
DN98-325-6 РНКi 300-08 №1 (15)	CYP82E4v2 и родственные гены	-	-	3,351	0,040	0,016	0,101	1,2
DN98-325-6 РНКi 300-02 №1 (15)	CYP82E4v2 и родственные гены	-	-	3,741	0,026	0,017	0,106	0,7
DN98-325-6 №775 гомозиготный (15)	CYP82E4v2	G986A	W329Stop	2,941	0,077	0,013	0,093	2,6
DN98-325-6 гомозиготный (14)	CYP82E5v2	G1266A	W422Stop	1,005	1,876	0,012	0,097	65,2
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (9)		двойная	двойная	3,160	0,076	0,015	0,117	2,3

^а Числа в скобках обозначают общее количество проанализированных растений.

^б Нумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК.

^в Проценты рассчитывали на основе сухой массы табака.

^г Процент превращения никотина определяли из уравнения: [% норникотина/(% норникотина + % никотина)]×100.

Хотя применение растений табака, несущих мутацию 775 или сопоставимые мутации в CYP82E4v2,

может представлять собой эффективное средство элиминации интродукции растений-конвертеров в популяции табака, в этих растениях все еще сохраняется небольшое, но имеющее существенное значение количество норникотина. С учетом того, что в трансгенных растениях, экспрессирующих конструкцию для РНКi, мишенью которой является CYP82E4v2 (Lewis и др., 2008), обнаружены уровни превращения никотина в норникотин, близкие к 0,45%, очевидно, что по меньшей мере еще один другой ген, последовательность которого обладает высокой гомологией с последовательностью ДНК CYP82E4v2, должен быть ответствен за основной синтез норникотина, присутствующий как в растениях, не являющихся конвертерами, так и в растениях-конвертерах, которые имеют неактивированный ген CYP82E4v2. Это предположение нашло дополнительное подтверждение, когда был обнаружен ген CYP82E5v2, последовательность ДНК которого на 92,7% идентична последовательности гена CYP82E4v2, который, как установлено, кодирует также функциональный фермент никотиндеметилазу (Dewey и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007). Низкий уровень экспрессии гена CYP82E5v2 никотиндеметилазы обнаружен в зеленых табачных листьях растений-конвертеров, а также растений, не являющихся конвертерами, в отличие от гена CYP82E4v2, для которого характерны очень высокие уровни экспрессии, но только в листьях растений-конвертеров в процессе старения и воздушной сушки.

Как описано у Dewey и др., 2007, скрининг популяции табака DN98-325-6, для обработки которой в качестве мутагена применяли ЭМС, позволил идентифицировать индивидуальное растение (растение 1013), несущее приводящую к "выключению" мутацию в гене CYP82E5v2. Для определения воздействия нефункционального аллеля *суп82е5v2* на накопление норникотина осуществляли скрещивания, которые позволяли объединять мутации из растений 775 и 1013. Молекулярное генетипирование нескольких особей F₂-поколения, полученных из F₁-потомства начального скрещивания, позволило идентифицировать девять особей, гомозиготных по обоим мутациям (*e4e4/e5e5*). Эти девять растений включали также в полевой опыт, проведенный в 2008 г. Несмотря на тот факт, что, как установлено, CYP82E5v2 кодирует функциональный фермент никотиндеметилазу (Dewey и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007), объединение нарушающей функцию мутации *суп82е5v2* с вызывающей "выключение" мутацией *суп82е4v2* оказывало очень небольшое воздействие на уровни норникотина в листьях. Как видно из табл. 1, у растений, гомозиготных по двойной мутации (*e4e4/e5e5*), средний уровень превращения никотина составлял 2,3%, для сравнения средний уровень превращения в растениях, несущих только мутацию *суп82е4v2* (*e4e4*), составлял 2,6%. Небольшое различие в среднем уровне превращения между двумя генотипами оказалось статистически незначимым ($P = 0,118$). В отличие от этого, в одной из трансгенных линий, включенной в этот опыт, в которой "молчание" CYP82E4v2 достигалось с помощью РНКi, средний уровень превращения в которой составлял 0,7%, количество оказалось значимо более низким ($P < 0,001$), чем полученное как для генотипа *e4e4*, так и для генотипа *e4e4/e5e5*. Таким образом, в геноме табака должен существовать другой ген с высокой гомологией с CYP82E4v2, который принимает участие в производстве норникотина в растениях.

Пример 1. Выделение и характеристика гена *суп82е10* никотиндеметилазы.

Для идентификации других генов в геноме табака, которые могут кодировать ферменты никотиндеметилазы, исследовали гомологию с помощью алгоритмов BLASTN и BLASTX (Altschul и др., 1990, 1997) с использованием баз данных для экспрессируемых секвенированных меток (ярлыков) (EST) в GenBank, применяя ДНК и белковые последовательности CYP82E4v2 в качестве соответствующих "запрашиваемых" последовательностей. Кроме того, для идентификации последовательностей кДНК, соответствующих ранее охарактеризованным представителям суперсемейства CYP82E (таким как CYP82E2, CYP82E3 и CYP82E5v2), было обнаружено семь EST, которые не соответствовали точно ни одному из ранее охарактеризованных представителей этого семейства генов.

Важно отметить, что все из семи EST, получали либо из библиотек специфических для корня кДНК, либо библиотек кДНК, созданных из смешанных тканей, которые включали корни. Эти данные позволяют предположить, что новый ген CYP82E экспрессируется специфически в ткани корня, указанная особенность позволяет объяснить, почему этот конкретный представитель суперсемейства CYP82E P450 ранее не был обнаружен, так как ранее исследования были сфокусированы на характеристике генов CYP82E, которые экспрессировались в листовой ткани. Поскольку никакой индивидуальной последовательности EST недостаточно для перекрытия полной кодирующей области этого нового гена, создавали ПЦР-праймеры, которые обладали способностью обеспечивать амплификацию полной последовательности кДНК из первой цепи кДНК, которую создавали из РНК, выделенной из ткани корня табака. Кроме того, применяли праймеры для амплификации соответствующей геномной области гена, которая включала центральный крупный интрон. Эта новая кДНК CYP82E характеризовалась идентичностью на уровне 92,4% от нуклеотидной последовательности кДНК гена CYP82E4v2 табака и предсказанной идентичностью на уровне 91,1% аминокислотных последовательностей. В соответствии с рекомендациями по номенклатуре гена P450 этот новый ген обозначили как CYP82E10. При сравнении со всеми охарактеризованными представителями суперсемейства CYP82E ген CYP82E10 отличается наиболее высоким уровнем сходства последовательностей с геном CYP82E5v2, при этом идентичность на уровне нуклеотидных последовательностей кДНК составляет 96,5% и предсказанная идентичность на уровне аминокислотных последовательностей составляет 95,7%. Последовательность ДНК CYP82E10 и пред-

сказанная белковая последовательность представлены на фиг. 1.

Хотя кДНК различных представителей семейства CYP82E имеют тенденцию к высокой консервативности, геномные версии этих генов отличаются существенно большим разнообразием последовательностей. Это прежде всего является следствием значительной дивергенции последовательностей, обнаруженной в крупном центральном интроне. Сравнительный анализ первичной структуры геномных последовательностей CYP82E4v2, CYP82E5v2 и CYP82E10 представлен на фиг. 2. Как рассчитано с помощью алгоритма выравнивания пар оснований EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html), нуклеотидные последовательности генов CYP82E4v2 и CYP82E10 идентичны на 78,3%, а нуклеотидная последовательность гена CYP82E10 идентична на 84,9% нуклеотидной последовательности гена CYP82E5v2, поскольку они присутствуют в геноме табака (геномные последовательности CYP82E4v2 и CYP82E5v2 идентичны на 75%).

Как подробно описано в нескольких публикациях, большинство генов суперсемейства CYP82E, обнаруженных в геноме табака, не кодируют функциональные ферменты никотиндеметилазы (Siminszky и др., 2005; Chakrabarti и др., 2007; Dewey и др., 2007; Gavilano и др., 2007; Xu и др., 2007a). Таким образом, только степень гомологии последовательностей является не очень точным индикатором функции генов семейства CYP82E. Вместо этого анализ экспрессии либо в трансгенных растениях (Siminszky и др., 2005), либо в дрожжах (Gavilano и Siminszky, 2007; Xu и др., 2007a) представляет собой признанное средство решения вопроса о том, кодируют ли индивидуальные представители этого семейства генов никотиндеметилазную активность.

Для решения вопроса о том, функционирует ли CYP82E10 в качестве гена никотиндеметилазы, его кДНК клонировали в дрожжевом экспрессионном векторе pYeDP60 и трансформировали им штамм дрожжей W(R). Штамм W(R) представляет собой клеточную линию дрожжей, которая была сконструирована с целью сверхэкспрессии дрожжевой НАДФ-Н-зависимой P450-редуктазы, фермента, который служит в качестве непосредственного донора электронов для P450; эта система позволяет в значительной степени повышать уровень выявления активности чужеродного фермента P450, экспрессируемого в дрожжах (Potron и др., 1995). Анализы никотиндеметилазы осуществляли путем инкубации препаратов микросомальных мембран дрожжей с [¹⁴C]-никотином и разделения продуктов с помощью тонкослойной хроматографии, согласно методу, описанному у Siminszky и др., 2005.

Как показано на фиг. 3, никакой никотиндеметилазной активности не удалось обнаружить при использовании микросом дрожжей штамма W(R), экспрессирующих только вектор pYeDP60. В противоположность этому выраженную никотиндеметилазную активность удалось обнаружить при оценке микросом, полученных из дрожжевых клеток, которые экспрессировали кДНК CYP82E10. Путем измерения ферментативной активности фермента CYP82E10 с использованием широкого спектра концентраций [¹⁴C]-никотина создавали кривую насыщения субстратом и с использованием анализа микросом было рассчитано кажущееся значение K_m , составлявшее 3,9 мкМ. Этот кинетический параметр для CYP82E10 очень близок к значениям K_m , опубликованным для ферментов CYP82E4v2 и CYP82E5v2 при их аналогичной экспрессии в дрожжах (Gavilano и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007; Xu и др., 2007a).

Пример 2. Идентификация растений, несущих мутантные аллели CYP82E10.

Для точной оценки специфического вклада CYP82E10 в общий уровень норникотина в растении табака необходимо: (1) идентифицировать растение табака, в гене которого присутствует приводящая к "выключению" мутация; и (2) объединить эту мутацию с мутациями *sur82e4v2* и *sur82e5v2*, полученными из растений 775 и 1013 соответственно. Для идентификации потенциально ослабляющих мутаций в гене CYP82E10 подвергали скринингу популяцию DN98-325-6, для обработки которой в качестве мутагена применяли ЭМС, для чего проводили широкомасштабный анализ последовательностей ДНК с использованием праймеров, которые обеспечивают специфическую амплификацию участков CYP82E10 (без одновременной амплификации других представителей суперсемейства CYP82E). Для специфической амплификации экзона 1 CYP82E10 применяли следующие ПЦР-праймеры: 5'-GTGATAGTTTGATCCCAAGTGC-3' ("прямой") и 5'-CTCCCAAAGTTAGATTAGTCCG-3' ("обратный"); для специфической амплификации экзона 2 применяли праймеры 5'-AGGTCGCGTGATTCTTG-3' ("прямой") и 5'-AGATGAATACCCATCTATCTAGGAGT-3' ("обратный"). Для гарантии максимальной специфичности "обратный" праймер для экзона 1 и "прямой" праймер для экзона 2 соответствовали последовательностям в интроне CYP82E10 (фиг. 1). ПЦР-амплификацию и анализ последовательностей мутантных растений осуществлял в 96-луночном формате согласно методу, описанному у Dewey и др., 2007.

Широкомасштабный анализ последовательностей свыше 1200 особей из мутантной популяции табака позволил идентифицировать 15 особей, несущих мутации в CYP82E10. Наиболее значимые из них представлены в табл. 2. Кроме того, на фиг. 1 выделены подчеркиванием измененные в результате мутации нуклеотиды и аминокислотные остатки в этих растениях. Хотя в этих особях не обнаружены укорачивающие мутации, в нескольких случаях идентифицированы мутации, которые изменяют аминокислотный остаток в высококонсервативной области фермента. Для определения воздействий конкретной мутации на активность фермента CYP82E10 применяли сайт-направленный мутагенез для интродукции специфических мутаций, которые соответствовали семи из девяти мутаций, представленных в табл. 2, в

кДНК СУР82Е10 в дрожжевом экспрессионном векторе рYeDP60. Препараты микросом из штаммов дрожжей, экспрессирующих каждый из семи вариантов СУР82Е10, анализировали *in vitro* в отношении никотиндеметиلاзной активности при использовании как ненасыщающей (2,45 мкМ), так и насыщающей (50 мкМ) концентрации [¹⁴С]-никотина. Результаты, полученные на основе анализов экспрессии в дрожжах, продемонстрировали, что мутации, обнаруженные в растениях 693, 817 и 1035, не изменяли ферментативную активность, а мутации, обнаруженные в растениях 1041, 1512 и 2476, приводили к полной инактивации фермента. Мутация, обнаруженная в растении 1442, приводила к снижению активности на 75% по сравнению с активностью фермента СУР82Е10 дикого типа.

Полученные с помощью тонкослойной хроматографии данные анализов *in vitro*, касающиеся экспрессии в дрожжах при наличии соответствующей мутации в растении 1041, представлены на фиг. 3. Указанная конкретная мутация была выбрана для более подробного изучения. Для дополнительного подтверждения того, что замена аминокислоты Pro на Ser в положении 381, которая соответствует мутации растения 1041, не совместима с функцией деметилирования никотина, именно эту мутацию интродуцировали в кДНК СУР82Е4v2, которую клонировали аналогичным образом в векторе рYeDP60. Результаты анализов этих дрожжей представлены в табл. 3. Замена на Ser Pro в положении 381, если она присутствовала в ферменте СУР82Е10 или СУР82Е4v2, приводила к полной элиминации никотиндеметилазной активности в этом анализе. Важно отметить, что хотя активность ферментов СУР82Е10 и СУР82Е4v2 дикого типа была сопоставима при использовании [¹⁴С]-никотина в не насыщающей концентрации (2,45 мкМ), при применении субстрата в концентрации 25 мкМ уровень синтеза [¹⁴С]-норникотина был примерно в три раза выше в препаратах микросом, содержащих фермент СУР82Е10, чем в препаратах, содержащих СУР82Е4v2.

Таблица 2

Обработанные ЭМС линии DH98-325-6, несущие мутации в гене СУР82Е10

Номер растения	Мутация ^a	Аминокислотная замена	Активность мутантного фермента ^b
2476	G235A	G79S	не выявлена
1512	C319T	P107S	не выявлена
319	C442T	L148F	не тестировали
634	G514A	G172R	не тестировали
1035	G1030A	A344T	100%
1041	C1141T	P381S	не выявлена
817	G1228A	A410T	100%
693	G1250A	R417H	100%
1442	C1255T	P419S	25%

^a Нумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК СУР82Е10.

^b Относительно активности фермента дикого типа при экспрессии в дрожжах.

Таблица 3

Никотиндеметилазная активность ферментов СУР82Е4v2 и СУР82Е10, несущих мутацию 1041 (Pro381Ser)

Вектор	СРМ норникотина при использовании в качестве субстрата 2,45мкМ [¹⁴ С]-никотина	СРМ норникотина при использовании в качестве субстрата 50,0мкМ [¹⁴ С]-никотина
рYeDP60-СУРЕ4v2	1,813±623 ^b	5,383±505
рYeDP60-СУРЕ4v2/1041	не выявлено	не выявлено
рYeDP60-СУРЕ10	2,296±99	15,253±465
рYeDP60-СУРЕ10/1041	не выявлено	не выявлено

^a Количество импульсов в минуту [¹⁴С]-норникотина/мг микросомального белка.

^b Стандартное отклонение, полученное при применении двух технических повторностей.

Никотиндеметилазную активность клеток дрожжей, экспрессирующих СУР82Е10 дикого типа и мутант 1041, анализировали также *in vivo*. Культуры дрожжей встряхивали в течение ночи в присутствии 55 мкМ [¹⁴С]-никотина, экстрагировали метанолом и анализировали с помощью тонкослойной хроматографии. [¹⁴С]-Норникотин был обнаружен в экстрактах дрожжей, экспрессирующих СУР82Е10 дикого типа, но он не был обнаружен в мутантной версии 1041 гена (данные не представлены). В целом, анализ экспрессии в дрожжах позволил предположить, что функция фермента СУР82Е10 с большой вероятностью полностью элиминируется при интродукции мутации 1041.

Пример 3. Объединение мутантных аллелей *sup82e10*, *sup82e4v2* и *sup82e5v2*.

С учетом того, что исходная мутация 1041 присутствует в генетическом фоне (DH98-325-6), который соответствует как аллелю сильного конвертера СУР82Е4v2, так и гену СУР82Е5v2 дикого типа,

единственный путь точного анализа специфического вклада CYP82E10 в общее содержание норникотина в растении, предусматривал интродукцию мутации 1041 в растения табака, которые несли также приводящие к "выключению" мутации CYP82E4v2 и CYP82E5v2. Для этой цели растения, гетерозиготные по мутации 1041 (e10E10), скрещивали с растениями, гетерозиготными по обоим описанным выше мутациям 775 и 1013 (e4E4/e5E5). Последние растения представляли собой потомков, полученных после скрещивания 775/1013//TN90/3/TN90/4/TN90. Растения поколения F₁, гетерозиготные по всем трем мутациям никотиндеметилаз (e4E4/e5E5/e10E10), идентифицировали путем молекулярного генотипирования и давали самоопыляться. Молекулярное генотипирование применяли также для скрининга свыше 400 растений поколения F₂ и затем группировали их в следующие генотипические классы: E4E4/E5E5/e10e10 (всего 3 растения); e4e4/E5E5/e10e10 (всего 4 растения); E4E4/e5e5/e10e10 (всего 5 растений) и e4e4/e5e5/e10e10 (всего 5 растений).

Все указанные выше растения пересаживали и выращивали в полевых условиях на исследовательской станции Upper Coastal Plains в г. Роки-Маунт, шт. Северная Каролина летом 2009 г. В этом опыт включали также два из тестируемых в полевом опыте, проведенных в 2008 г., генотипов, которые представлены в табл. 1. В частности, для сравнения в опыт включали десять растений DN98-325-6, гомозиготных только по мутации сур82e4v2 (e4e4/E5E5/E10E10), и одиннадцать растений DN98-325-6, имеющих генотип, гомозиготный по двум мутациям e4e4/e5e5/E10E10. В опыт включали также в качестве контролей отдельные растения, произвольно отобранные из лота поступающих в продажу семян "слабого конвертера" (TN90LC), особи DN98-325-6 дикого типа и растения из наиболее эффективных трансгенных линий, у которых для подавления CYP82E4v2 использовали РНКi. После достижения растениями высоты в среднем 30 см (35 дней после пересадки) собирали листья, одинаково расположенные на стебле, обрабатывали этефоном и сушили на воздухе согласно протоколу, разработанному Jack и др., 2007. Содержание алкалоидов высушенного листового материала определяли с помощью газовой хроматографии согласно указанному протоколу.

В табл. 4 и на фиг. 4 представлены результаты анализа алкалоидов, полученные при проведении полевого опыта в 2009 г. В соответствии с полученными ранее данными индивидуальная вызывающая "выключение" мутация сур82e4v2 оказывала отрицательное воздействие на фенотип сильного конвертера линии DN98-325-6, а также приводила к проявлению фенотипа, отличающегося существенно более низким уровнем накопления норникотина по сравнению с растениями, выращенными из поступающих в продажу семян TN90LC (уровень превращения 2,2% по сравнению с 7,1% соответственно). Как установлено в полевом опыте, проведенном в 2008 г. (табл. 1), объединение мутации сур82e5v2 с мутацией сур82e4v2 не приводило к дальнейшему снижению содержания норникотина. Так, средний уровень превращения в растениях генотипа e4e4/E5E5/E10E10 был фактически ниже по сравнению с уровнем превращения в особях генотипа e4e4/e5e5/E10E10 (2,2% по сравнению с 2,3%), однако указанное небольшое различие оказалось статистически незначимым. Как и ожидалось, мутация сур82e10 не влияла на высокий уровень норникотина, обусловленный активным геном CYP82E4v2, либо индивидуально (генотипы E4E4/E5E5/e10e10), либо в сочетании с мутантным аллелем сур82e5v2 (генотипы E4E4/e5e5/e10e10) (фиг. 4А). Аналогично результатам, полученным для двойного мутанта сур82e4v2 и сур82e5v2 (табл. 1 и 4), интродукция сур82e10 в генетический фон сур82e4v2 не обладала эффективностью в отношении снижения уровней норникотина по сравнению с уровнями, которые достигались при наличии только мутации сур82e4v2 (фиг. 4Б). Для генотипов e4e4/E5E5/e10e10 характерно превращение в среднем 1,85%, что статистически незначимо отличалось от среднего уровня превращения 2,2%, обнаруженного для особей, имеющих генотип e4e4/E5E5/E10E10 (P = 0,235).

Таблица 4

Профили алкалоидов в экспериментальном материале, которые оценивали в полевом опыте в 2009 г. Для оценки использовали листья, собранные через 35 дней после пересадки. Величины, выраженные в процентах, представляют собой средние значения

Генотип	Ген-мишень	Мутация ^б	Аминокислотная замена	Содержание никотина ^а (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения ^г
DN98-325-6 контроль (8) ^а	контроль	-	-	0,133	1,553	0,009	0,085	92,21
TN90LC (11)	контроль	-	-	1,519	0,104	0,002	0,065	7,15
DN98-325-6 РНКi 300-02 №1 (10)	<i>CYP82E4v2</i> и родственные гены	-	-	1,747	0,009	0,003	0,063	0,64
DN98-325-6 №775 гомозиготный (10)	<i>CYP82E4v2</i>	G986A	W329Stop	1,375	0,030	0,0002	0,057	2,20
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (11)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E5v2</i>	двойная	двойная	1,524	0,036	0,003	0,084	2,34
DN980325-6 №1041 гомозиготный (3)	<i>CYP82E10</i>	C1141T	P381S	0,082	1,302	0,007	0,073	93,87
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (5)	<i>CYP82E5v2</i> <i>CYP82E10</i>	двойная	двойная	0,081	1,345	0,010	0,068	94,31
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (4)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E101</i>	двойная	двойная	2,168	0,045	0,004	0,087	1,85
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (5)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E5v2</i> <i>CYP82E10</i>	тройная	тройная	1,793	0,012	0,003	0,056	0,055

^а Числа в скобках обозначают общее количество проанализированных растений.

^б Нумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК.

^в Проценты рассчитывали на основе сухой массы табака.

^г Процент превращения никотина определяли из уравнения $[\% \text{ норникотина} / (\% \text{ норникотина} + \% \text{ никотина})] \times 100$.

Хотя мутации *сур82е5v2* и *сур82е10* не приводили к значимому снижению содержания норникотина в несущих *сур82е4v2* растениях, при объединении индивидуальных мутаций наличие всех трех мутаций никотиндеметилаз оказывало заметное действие. Превращение никотина в норникотин в несущих три мутации растениях (*е4е4/е5е5/е10е10*) составляло в среднем только 0,55%, т.е. процент фактически идентичен 0,54%, обнаруженному в трансгенной линии, полученной путем подавления с помощью РНКi ($P = 0,893$; фиг. 4Б). Это представляет собой практически 3-кратное снижение превращения никотина по сравнению со снижением, опосредуемой только мутацией *сур82е4v2*. Различия в проценте превращения никотина (и накоплении норникотина в процентах в пересчете на общую сухую массу) между генотипами *е4е4/Е5Е5/Е10Е10* и *е4е4/е5е5/е10е10* оказалось статистически высокозначимыми ($P < 0,0001$). Аналогично результатам, полученным в исследовании опосредуемого РНКi-подавления превращения никотина (Lewis и др., 2008), не является очевидным, что наличие нетрансгенного изменения активности никотиндеметилаз в растении табака, может приводить к существенному изменению содержания минорных видов алкалоидов анатабина и анабазина.

Влияние одновременного присутствия трех независимых мутаций генов никотиндеметилаз тестировали также в полевом опыте, проведенном в вегетационный сезон в 2010 г. Для этого исследования осуществляли скрещивание полного генетического фона DN98-325-6 (в отличие от опыта, проведенного в 2009 г., в котором применяли также в качестве родителя TN90). И в этом исследовании применяли молекулярное генотипирование для создания каждой из возможных комбинаций, необходимых для определения относительного вклада каждого локуса *CYP82E* в фенотип, касающийся норникотина. Получали данные о профилях алкалоидов в растениях табака, которые выращивали до стадии созревания и сушили согласно стандартной промышленной практике. Как видно из табл. 5, высокой уровень превращения никотина (составляющий от 52,4 до 65,59%) обнаружен во всех генотипах, гомозиготных по гену *CYP82E4v2* дикого типа (генотипы *Е4Е4/Е5Е5/Е10Е10*, *Е4Е4/е5е5/Е10Е10*, *Е4Е4/Е5Е5/е10е10* и *Е4Е4/е5е5/е10е10*). В растениях, гомозиготных только по мутации *сур82е4v2* (*е4е4/Е5Е5/Е10Е10*), средний уровень превращения никотина в норникотин составлял 2,91%.

Аналогично результатам, полученным в 2009 г., установлено, что воздействие мутаций *сур82Е5v2* и *сур82Е10* не было аддитивным и проявлялось только в случае, когда все три мутантных локуса накапливались вместе. В растениях DN98-325-6 (*е4е4/Е5Е5/е10е10*) средние уровни превращения составляли 2,89%, и в особях DN98-325-6 (*е4е4/е5е5/Е10Е10*) средние уровни превращения составляли 2,52%, т.е. эти значения не отличались статистически достоверно от уровней, обнаруженных при наличии только мутации *сур82е4v2*. В противоположность этому, снижение уровня норникотина, обнаруженное в растениях с включающим три мутации генотипом DN98-325-6 (*е4е4/е5е5/е10е10*) (уровень превращения никотина 1,11%) оказался в 2,6 раз ниже по сравнению с уровнем, обусловленным присутствием только мутации *сур82е4v2*. Снижение уровня превращения никотина, связанное с наличие комбинации трех мутаций, оказалось статистически высоко значимым ($P < 0,001$) по сравнению с присутствием как только мутации *сур82е4v2*, так и комбинации двух мутаций.

Таблица 5

Профили алкалоидов для генотипов DN98-325-6, несущих различные комбинации мутаций в локусах CYP82E4v2 (E4), CYP82E5v2 (E5) и CYP82E10 (E10). Данные представляют собой средние значения, полученные по пяти повторностям, и полученные с помощью анализа смеси, содержащей измельченные образцы четвертого и пятого листа, взятых с верхушки растения

Генотип	Содержание никотина (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения
DN98-325-6 E4E4 E5E5 E10E10	1,76	2,46	0,02	0,17	58,66
DN98-325-6 e4e4 E5E5 E10E10	2,61	0,08	0,01	0,09	2,91
DN98-325-6 E4E4 e5e5 E10E10	1,08	2,06	0,02	0,14	65,59
DN98-325-6 E4E4 E5E5 e10e10	1,40	1,96	0,01	0,13	59,30
DN98-325-6 e4e4 e5e5 E10E10	3,25	0,09	0,02	0,16	2,89
DN98-325-6 e4e4 E5E5 e10e10	3,59	0,09	0,01	0,12	2,52
DN98-325-6 E4E4 e5e5 e10e10	1,59	1,72	0,01	0,09	52,40
DN98-325-6 e4e4 e5e5 e10e10	4,18	0,05	0,02	0,13	1,11

Процентное содержание алкалоидов рассчитывали на основе сухой массы. Процент превращения никотина определен из уравнения: $[\% \text{ норникотина} / (\% \text{ норникотина} + \% \text{ никотина})] \times 100$.

Заключение.

На основе представленного и охарактеризованного в настоящем описании нового гена никотиндеметилазы, CYP82E10, оказалось возможным разработать стратегию снижения уровней превращения никотина (и, как следствие, снижения уровней норникотина) в листьях имеющих коммерческое значения высушенных на воздухе растений табака до уровней, которые ранее можно было получать только с использованием подходов, основанных на применении трансгенов. Такая не основанная на применении ГМО технология может обеспечивать снижение уровней норникотина до уровня, близкого к уровню, который достигался с помощью основанных на применении трансгенов стратегий, при этом она обладает очень большим преимуществом, поскольку открывает пути создания сортов табака с ультранизким содержанием норникотина, обходя при этом значительные барьеры, ассоциированные с коммерциализацией трансгенных культур, такие как: (1) переговоры и оплата лицензионных пошлин за некоторые разрешенные технологии, требуемые для создания трансгенных растений; (2) необходимость избегать больших временных и обременительных материальных затрат, ассоциированных с нарушением регуляции трансгенных случаев; и (3) возможность получения отказа от продукта конечными потребителями, жизненная философия которых не допускает применение ГМО. Исследование, представленное в настоящем описании, представляет собой очень значительное достижение с позиций возможности снижения уровней одного из наиболее хорошо известных сильных карциногенов, обнаруженного в табачных изделиях, по сравнению с описанными ранее стратегиями, не основанными на использовании ГМО, направленными на интродукцию мутаций только в ген CYP82E4v2 никотиндеметилазы (Julio и др., 2008; Xu и др., 2007b) или объединенных мутаций CYP82E4v2 и CYP82E5v2 (Dewey и др., 2007). С помощью трансгенных технологий ранее продемонстрировано, что снижение уровней превращения никотина с ~2,6 до ~0,5% в высушенных листьях приводит также к соответственному снижению NNN в листьях (Lewis и др., 2008). Следует ожидать также аналогичного снижения содержания NNN в листьях табака, содержащих комбинацию трех мутаций (e4e4/e5e5/e10e10), представленную в настоящем описании. Хотя эта технология исходно была разработана для табака, предназначенного для сушки на воздухе, ее с успехом можно применять для сортов, которые предназначены для сушки на пару. По мере старения теплообменников их способность удалять газы NO_x в процессе сушки на пару может снижаться. Кроме того, в современных исследованиях установлено, что при хранении высушенных листьев может происходить образование значительных количеств TSNA. Минимизация уровней норникотина посредством интродукции комбинации трех мутантов в сорта, предназначенные для сушки на пару, может являться средством защиты от образования NNN либо в процессе хранения, либо в результате неэффективного теплообмена в процессе сушки.

Ссылки

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. и Lipman D.J., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215, 1990, сс. 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. и Lipman D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25, 1997, сс. 3389-3402.
- Brogan A.P., Dickerson T.J., Boldt G.E. и Janda K.D., Altered retinoid homeostasis catalyzed by nicotine metabolite: implications in macular degeneration and normal development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2005, сс. 10433-10438.
- Boyette M.D. и Hamm L.A., Results of year 2000 TSNA sampling program in flue-cured tobacco, *Rec. Adv. Tob. Sci.* 27, 2001, сс. 17-22.
- Bush L.P., Cui M., Shi PL, Burton H.R., Fannin F.F., Lei L. и Dye N., Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco, *Rec. Adv. Tob. Sci.* 27, 2001, сс. 23-46.
- Chakrabarti M., Meekins K.M., Gavilano L.B. и Siminszky B., Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco, *New Phytol.* 175, 2007, сс. 565-574.
- Dewey R.E., Siminszky B., Bowen S.W. и Gavilano L., Alteration of tobacco alkaloid content through modification of specific cytochrome P450 genes, заявка на патент США 60/987243, 2007.
- Dickerson T.J. и Janda K.D., A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, сс. 15084-15088.

Gavilano L.B., Coleman N.P., Bowen S.W. и Siminszky B., Functional analysis of nicotine demethylase genes reveals insights into the evolution of modern tobacco, *J. Biol. Chem.* 282, 2007, сс. 249-256.

Gavilano L.B. и Siminszky B., Isolation and characterization of the cytochrome P450 gene CYP82E5v2 that mediates nicotine to nornicotine conversion in the green leaves of tobacco, *Plant Cell Physiol.* 48, 2007, сс. 1567-1574.

Hecht S.S., Biochemistry, biology and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1998, сс. 559-603.

Hecht S.S., Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nature Rev.* 3, 2003, сс. 733-744.

Hecht S.S. и Hoffmann D., The relevance of tobacco specific nitrosamines to human cancer, *Cancer Surveys* 8, 1990, сс. 273-294.

Hoffmann D., Brunneemann K.D., Prokopczyk B. и Djordjevic M.V., Tobacco-specific N-nitros amines and Areca-derived N-nitrosamine chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans, *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 1994, сс. 1-52.

Jack A., Fannin N. и Bush L.P., Implications of reducing nornicotine accumulation in burley tobacco: Appendix A - The LC Protocol. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 33, 2007, сс. 58-79.

Julio E., Laporte F., Reis S., Rothan C. и Dorlhac de Borne F., Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding, *Mol. Breed.* 21, 2008, сс. 369-381.

Katz J., Caudle R.M., Bhattacharyya I., Stewart CM. и Cohen D.M., Receptor for advanced glycation end product (RAGE) upregulation in human gingival fibroblasts incubated with nornicotine, *J. Periodontol.* 76, 2005, сс. 1171-1174.

Lewis R.S., Jack A.M., Morris J.W., Robert V.J.M., Gavilano L., Siminszky B., Bush L.P., Hayes A.J. и Dewey R.E., RNAi-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves, *Plant Biotech. J.* 6, 2008, сс. 346-354.

Peele D.M. и Gentry J.S., Formation of tobacco-specific nitrosamines in flue-cured tobacco, COPvESTA Meeting, Agro-Phyto Groups, Suzhou, China, 1999.

Pompon D., Louerat B., Bronne A. и Urban P., Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments, *Methods Enzymol.* 272, 1995, сс. 51-64.

Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W. и Dewey R.E., Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2005, сс. 14919-14924.

Wernsman E.A. и Matzinger D.F., Time and site of nicotine conversion in tobacco, *Tob. Sci.* 12, 1968, сс. 226-228.

Xu D., Shen Y., Chappell J., Cui M. и Nielsen M., Biochemical and molecular characterization of nicotine demethylase in tobacco, *Physiol. Plantarum* 129, 2007a, сс. 307-319.

Xu D., Nielsen M.T. и Shen Y., Tobacco plants having a mutation in a nicotine demethylase gene, заявка на патент США 20070199097, 2007b.

Целый ряд модификаций и других вариантов осуществления представленного в настоящем описании изобретения должен стать очевидным для специалиста в области, к которой относится данное изобретение.

обретение, после ознакомления с его преимуществами, изложенными в приведенном выше описании, и прилагаемыми чертежами. Таким образом, следует понимать, что объем изобретения не ограничен конкретными представленными в настоящем описании вариантами изобретения и под объем перечисленных вариантов осуществления изобретения и прилагаемой формулы изобретения подпадают также модификации и другие варианты осуществления изобретения. Хотя в настоящем описании использованы конкретные понятия, они применяются только в их общем и описательном смысле и не направлены на ограничение объема изобретения.

Все процитированные в описании публикации и заявки на патент отражают уровень техники, известный специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в настоящее описание в качестве ссылки в той же самой степени, как если бы было указано, что каждая индивидуальная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально включена в качестве ссылки.

Перечень последовательностей

<110> НОРТ КАРОЛИНА СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ

<120> Композиции и способы, предназначенные для минимизации синтеза никотина в растениях табака

<130> 035051/400712

<150> 61/295,671
<151> 2010-01-15

<160> 40

<170> FastSEQ для версии 4.0 Windows

<210> 1
<211> 1551
<212> ДНК
<213> *Nicotiana tabacum*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1551)
<223> Кодирует никотиндеметилазу CYP82E10

<400> 1
atg gtt tct ccc gta gaa gcc atc gta gga cta gta act ctt aca ctt 48
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
ctc ttc tac ttc ata cgg acc aaa aaa tct caa aaa cct tca aaa cca 96
Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
tta cca ccg aaa atc ccc gga ggg tgg ccg gta atc ggc cat ctt ttc 144
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
tat ttc gat gac gac agc gac gac cgt cca tta gca cga aaa ctc gga 192
Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
gac tta gct gac aaa tac ggc ccg gtt ttc act ttt cgg cta ggc ctt 240
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80

033565

aaa atg gag gtt aat gca gaa gga aat gaa caa gat ttc att gat gtg	864
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val	
275 280 285	
gtg ctt tca aaa atg agt aat gaa tat ctt gat gaa ggc tac tct cgt	912
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg	
290 295 300	
gat act gtc ata aaa gca aca gtg ttt agt tta gtc ttg gat gct gcg	960
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala	
305 310 315 320	
gac aca gtt gct ctt cac atg aat tgg gga atg gca tta ttg ata aac	1008
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn	
325 330 335	
aat caa cat gcc ttg aag aaa gcg caa gaa gag ata gat aaa aaa gtt	1056
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val	
340 345 350	
ggt aag gat aga tgg gta gaa gag agt gat att aag gat ttg gta tac	1104
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr	
355 360 365	
ctc caa act att gtt aaa gaa gtg tta cga tta tat cca ccg gga cct	1152
Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro	
370 375 380	
tta tta gta ccc cat gaa aat gta gag gat tgt gtt gtt agt gga tat	1200
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr	
385 390 395 400	
cac att cct aaa ggg act aga cta ttc gcg aac gtt atg aaa tta cag	1248
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln	
405 410 415	
cgc gat cct aaa ctc tgg tca aat cct gat aag ttc gat cca gag aga	1296
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg	
420 425 430	
ttt ttc gct gct gat att gac ttt cgt ggt caa cac tat gag ttt atc	1344
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile	
435 440 445	
cca ttt ggt tct gga aga cga tct tgt ccg ggg atg act tat gca atg	1392
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met	

033565

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
 500 505 510
 Thr Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 3

<211> 818
 <212> ДНК
 <213> *Nictotiana tabacum*

<220>
 <221> интрон
 <222> (1)...(818)
 <223> Интрон гена CYP82E10

<400> 3
 gtaagttcat ctcatTTTTc atttattctt tgaggaatag acaggttaat agtaatttaa 60
 gtaattagat tatctaaata ctaaggatga gtaaataatgg caaaaatata gaatgataaa 120
 tggaaaagga tgataatTTTt ttatgcccgg actaatctaa ctttgggagt taaagcactt 180
 cctaccaata gggactTTTTc ttcaagctcg atcttgatga aactctgtgg ttaaaaaaat 240
 gagatatanc caattataat tgatagaata aaactttatt actcccattg agcataacaa 300
 aacaaaaaaa agtaaagggg cttcttctct tttttaggga gaaattcttt gattgtttgt 360
 taatatagat tcatgtTTTTt ttttatttct aataataatt gtgcttgaat caggtcgсgc 420
 tgattcttgg ctttttagca gcaatagagt caaagctaат atacatatta tttggTTTTc 480
 gaataagtta tactgaaatt atataatacg ggtattaaat aataacatga ttatttatag 540
 gatatgcttt ttttattggg taaatatatt ttttttaatt aaaaatgaaa tatacaagta 600
 aggtataaaa cactatTTTg ttttacctga gataaatttg cctctgtaca tctctaagag 660
 aagagctgaa ataaatgaat tttaaatttc agaaaaaat aaattcatta gtataatgag 720
 atgtcgatac ttgacaatta ctatactaac tagaacaagg ttcagcagat agtgacgcta 780
 acctatTTTTt gtattgaatt attctaattt gtccacag 818

<210> 4
 <211> 2636
 <212> ДНК
 <213> *Nicotiana tabacum*

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)...(114)
 <223> 5' UTR CYP82E10
 <220>
 <221> экзон
 <222> (115)...(1053)
 <223> Последовательность экзона 1 CYP82E10
 <220>
 <221> интрон
 <222> (1054)...(1871)
 <223> Последовательность интрона CYP82E10
 <220>
 <221> экзон
 <222> (1872)...(2483)
 <223> Последовательность экзона 2 CYP82E10
 <220>

<221> 3'UTR

<222> (2484)...(2636)

<223> 3' UTR CYP82E10

<400> 4

```

ttttcaatth ttgttactth tgtatthtate atattattat gcatagccct aaattatcta 60
taaaagggaa gttggtgata gtttgattcc caagtgctth tctaaaaatc cataatggth 120
tctcccgtag aagccatcgt aggactagta actcttacac ttctcttcta cttcatacgg 180
accaaaaaat ctcaaaaacc ttcaaaaacca ttaccaccga aaatccccgg aggggtggccg 240
gtaatcggcc atctthtcta tttcgtatgac gacagcgcag accgtccatt agcacgaaaa 300
ctcgggagact tagctgacaa atacggccccg gthtttactth ttcgggctagg ccttccgctt 360
gtgttagttg taagcagttta cgaagctata aaagactgct tctctacaaa tgatgccatt 420
ttctccaatc gtccagctth tctthtatggc gaataccttg gctacaataa tgccatgcta 480
ttthtgacaa aatacggacc ttactggcga aaaaatagaa aattagtcat tcaggaagth 540
ctctgtgcta gtcgtctcga aaaattgaag cacgtgagat ttggtgaaat tcagacgcgc 600
attaagaath tatacactcg aattgatgga aattcgcgta cgataaatct aaccgattgg 660
ttagaagaat tgaatthtgg tctgatcgtg aaaatgatcg ctgggaaaaa ttagaatcc 720
ggtaaaaggag atgaacaagt ggagagatth aggaaagcgt ttaaggatth tataatthta 780
tcaatggagt ttgtgttatg ggatgcttht ccaattccat tgttcaaatg ggtggattht 840
caaggccatg ttaaggccat gaaaaggaca tthaaggata tagattctgt thttcagaat 900
tggttagagg aacatgtcaa gaaaaagaa aaaatggagg ttaatgcaga aggaaatgaa 960
caagatthca ttgatgtggt gctthcaaaa atgagtaatg aatatcttga tgaaggctac 1020
tctcgtgata ctgtcataaa agcaacagtg tttgtaagth catctcattt thcattthatt 1080
ctthtgaggaa tagacaggtt aatagtaath taagtaatta gattatctaa atactaagga 1140
tgagtaaata tggcaaaaat atagaatgat aaatggaaaa ggatgataat thtttatgcc 1200
cggactaatc taactthtggg agthaaagca ctctctacca atagggactth thcttcaagc 1260
tcgatcttga tgaactctg tggthaaaaa aatgagatat anccaathat aattgataga 1320
ataaaactth attactccca ttgagcataa caaaacaaa aaaagtaag ggactthctt 1380
tctthtthtag ggagaaathc thtgattgth tgttaatata gattcatgth thttthtatt 1440
tctaataata attgtgcttg aatcaggtcg cgtgattct tggctthtta gcagcaatag 1500
agtcaaagct aatatacata ttatttggtt ttcgaataag ttatactgaa attatataat 1560
acgggtatta aataataaca tgattatthta taggatatgc thttthtatt gggtaaatat 1620
althththlll althaaaaalq aaatalacaa gtaagglala aaacacclal tgalthlllaca 1680
ctagataaat ttgccctcgt acatctctaa gagaagagct gaaataaatg aaththtaaat 1740
ttcagaaaaa aataaathca ttagtataat gagatgtcga tacttgacaa ttactatact 1800
aactagaaca aggttcagca gatagtgcgc ctaacctatt thtgtattga attatthctaa 1860
thtgtccaca gagtthtagtc ttggatgctg cggacacagt tgctcttcac atgaattggg 1920
gaatggcatt attgataaac aatcaacatg ccttgaagaa agcgcaagaa gagatagata 1980
aaaaagttgg taaggataga tgggtagaag agagtgatat taaggatthg gtatacctcc 2040
aaactattht taaagaagtg ttacgattat atccaccggg acctthatta gtaccccatg 2100
aaaatgtaga ggattgtgth gttagtggat atcacattcc taaagggact agactatthc 2160
cgaacgttat gaaattacag cgcgatccta aactctggtc aaatcctgat aagttcgcac 2220
cagagagatt thtgcgtgct gatattgact thcgtggtca aactatgag thtatcccat 2280
ttggttctgg aagacgatct tgtccgggga tgacttatgc aatgcaagtg gaacacctaa 2340
caatcgcaca cttgatccag ggtthcaath acaaaactcc aatgacgcag cccttgata 2400
tgaaggaagg tgcaggatta actatacgtta aggtaaatcc tatagaagtg gtaattacgc 2460
ctcgcctgac acctgagctt tathaaaatc taagatgtht tatcttggth gatcattgth 2520
taatactcct agatagatgg gtatthcatct atctththta aathaattht cagtacgcag 2580

```

gtttctaatt tggtaagttt gtaacaacaa gtaaagaagg attgtgctag tatgta 2636

<210> 5

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E10 L148F

<400> 5

```

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1                    5                10                15
Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
   20                    25                30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
   35                    40                45
Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
   50                    55                60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65                    70                75                80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
   85                    90                95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
  100                    105                110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
  115                    120                125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
  130                    135                140
Ala Ser Arg Phe Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145                    150                155                160
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
  165                    170                175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
  180                    185                190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
  195                    200                205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210                    215                220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225                    230                235                240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
  245                    250                255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260                    265                270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val

```

033565

```

                275                280                285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290                295                300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305                310                315                320
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
                325                330                335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
                340                345                350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
                355                360                365
Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
                370                375                380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385                390                395                400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
                405                410                415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
                420                425                430
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
                435                440                445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
                450                455                460
Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465                470                475                480
Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
                485                490                495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
                500                505                510
Thr Pro Glu Leu Tyr
                515

```

<210> 6

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E10 G172R

<400> 6

```

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1                5                10                15
Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
                20                25                30

```

033565

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Arg Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln

033565

405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
 500 505 510
 Thr Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 7

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(7)

<223> Вариант CYP82E10 A344T

<400> 7

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

033565

Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Thr Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
 500 505 510
 Thr Pro Glu Leu Tyr
 515

033565

<210> 8
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E10 A410T

<400> 8
 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val

033565

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln

033565

```

          405          410          415
His Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
          420          425          430
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
          435          440          445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
          450          455          460
Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465          470          475          480
Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
          485          490          495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
          500          505          510
Thr Pro Glu Leu Tyr
          515

```

<210> 10

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E10 P419S

<400> 10

```

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

```


033565

<210> 11
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E10 G79S

<400> 11
 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Ser Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270

033565

Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
 500 505 510
 Thr Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 12

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E10 P107S

<400> 12

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15

033565

Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Ser Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr

033565

130						135									140
Ala	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys	His	Val	Arg	Phe	Gly	Glu	Ile	Gln
145						150				155					160
Thr	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Tyr	Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr
						165				170					175
Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Val
						180				185					190
Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Glu	Gln
						195				200					205
Val	Glu	Arg	Phe	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Ile	Leu	Ser	Met
						210				215					220
Glu	Phe	Val	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Trp	Val
225						230				235					240
Asp	Phe	Gln	Gly	His	Val	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile
						245				250					255
Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Trp	Leu	Glu	Glu	His	Val	Lys	Lys	Lys	Glu
						260				265					270
Lys	Met	Glu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Asp	Val
						275				280					285
Val	Leu	Ser	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg
						290				295					300
Asp	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala
305						310				315					320
Asp	Thr	Val	Ala	Leu	His	Met	Asn	Trp	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn
						325				330					335
Asn	Gln	His	Ala	Leu	Lys	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Lys	Lys	Val
						340				345					350
Gly	Lys	Asp	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr
						355				360					365
Leu	Gln	Thr	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Leu	Tyr	Ser	Pro	Gly	Pro
						370				375					380
Leu	Leu	Val	Pro	His	Glu	Asn	Val	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Tyr
385						390				395					400
His	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Ala	Asn	Val	Met	Lys	Leu	Gln
						405				410					415
Arg	Asp	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Pro	Asp	Lys	Phe	Asp	Pro	Glu	Arg
						420				425					430
Phe	Phe	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Phe	Arg	Gly	Gln	His	Tyr	Glu	Phe	Ile
						435				440					445
Pro	Phe	Gly	Ser	Gly	Arg	Arg	Ser	Cys	Pro	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Met
						450				455					460
Gln	Val	Glu	His	Leu	Thr	Ile	Ala	His	Leu	Ile	Gln	Gly	Phe	Asn	Tyr
465						470				475					480
Lys	Thr	Pro	Asn	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Lys	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu
						485				490					495
Thr	Ile	Arg	Lys	Val	Asn	Pro	Ile	Glu	Val	Val	Ile	Thr	Pro	Arg	Leu
						500				505					510

Thr Pro Glu Leu Tyr
515

<210> 14

<211> 517

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 14

Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg

033565

Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 16

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 D171N

<400> 16

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

033565

Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asn Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 17
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E4 E201K

<400> 17

Met	Leu	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Ile	Val	Gly	Leu	Val	Thr	Phe	Thr	Phe
1				5					10					15	
Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Trp	Thr	Lys	Lys	Ser	Gln	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro
			20					25					30		
Leu	Pro	Pro	Lys	Ile	Pro	Gly	Gly	Trp	Pro	Val	Ile	Gly	His	Leu	Phe
			35				40						45		
His	Phe	Asn	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly
						55						60			
Asp	Leu	Ala	Asp	Lys	Tyr	Gly	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	Arg	Leu	Gly	Leu
65					70					75					80
Pro	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ala	Val	Lys	Asp	Cys	Phe
				85					90					95	
Ser	Thr	Asn	Asp	Ala	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Gly
			100					105					110		
Asp	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Met	Leu	Phe	Leu	Ala	Asn	Tyr	Gly
		115					120					125			
Pro	Tyr	Trp	Arg	Lys	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ile	Gln	Glu	Val	Leu	Ser
						135						140			
Ala	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ala	Arg	Ile	Gln
145					150					155					160
Ala	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Tyr	Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr
				165					170					175	
Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Val
			180					185					190		
Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Tyr	Lys	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Glu	Gln
		195					200						205		
Val	Glu	Arg	Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Met	Ile	Leu	Ser	Met
		210				215						220			
Glu	Phe	Val	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Trp	Val
225					230					235					240
Asp	Phe	Gln	Gly	His	Val	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile
				245					250					255	
Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Trp	Leu	Glu	Glu	His	Ile	Asn	Lys	Arg	Glu
			260					265					270		
Lys	Met	Glu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Asp	Val

033565

```

      275              280              285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
  290              295              300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305              310              315              320
Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
      325              330              335
Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
      340              345              350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
      355              360              365
Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
      370              375              380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385              390              395              400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
      405              410              415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
      420              425              430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
      435              440              445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
      450              455              460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465              470              475              480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
      485              490              495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
      500              505              510
Ala Pro Glu Leu Tyr
      515

```

<210> 18

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 R169Q

<400> 18

```

Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
  1              5              10              15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro

```

033565

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

033565

His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 19
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E4 G459R

<400> 19
 Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1 5 10 15
 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140

033565

Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Arg Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr

515

<210> 20

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 T427I

<400> 20

```

Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1                               5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
 145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu

```

033565

260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Ile Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 21
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E4 V376M

<400> 21
 Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe

033565

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

033565

Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 22
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(328)
 <223> ВАРИАНТ CYP82E4 W329Stop

<400> 22
 Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1 5 10 15
 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125

033565

Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
 145 150 155 160
 Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn
 325

<210> 23

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 K364N

<400> 23

Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1 5 10 15
 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60

033565

Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
 145 150 155 160
 Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Asn Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile

033565

180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Ser Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 25

<211> 517

033565

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 P458S

<400> 25

```

Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1                               5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
 145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
 210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
 260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300

```

033565

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Ser Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 26

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 26

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe

033565

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

033565

Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 27
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E5 P72L

<400> 27
 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Leu Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205

033565

Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 28
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

033565

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E5 L143F

<400> 28

```

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1                    5                10                15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
      20                25                30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
      35                40                45
Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
      50                55                60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
      65                70                75                80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
      85                90                95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
      100               105               110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
      115               120               125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Phe Ser
      130               135               140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
      145               150               155               160
Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
      165               170               175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
      180               185               190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
      195               200               205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
      210               215               220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
      225               230               235               240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
      245               250               255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
      260               265               270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
      275               280               285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
      290               295               300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
      305               310               315               320
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn

```

033565

325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 29

<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E5 S174L

<400> 29

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu

033565

Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 30
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E5 M224I

<400> 30
 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190

033565

Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Ile
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
 Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 31

<211> 517

<212> PRT

033565

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E5 P235S

<400> 31

```

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1                               10                15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
      20                               25                30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
      35                               40                45
Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
      50                               55                60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
      65                               70                75                80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
      85                               90                95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
      100                              105               110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
      115                              120               125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
      130                              135               140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
      145                              150               155               160
Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
      165                              170               175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
      180                              185               190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
      195                              200               205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
      210                              215               220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Ser Leu Phe Lys Trp Val
      225                              230               235               240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
      245                              250               255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
      260                              265               270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
      275                              280               285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
      290                              295               300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala

```


033565

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

033565

Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445
 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480
 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510
 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 33

<211> 421

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(421)

<223> Вариант CYP82E5 W422Stop

<400> 33

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

033565

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415
 Arg Asp Pro Lys Leu
 420

<210> 34
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
 <221> Вариант
 <222> (1)...(517)
 <223> Вариант CYP82E5 P449L

<400> 34
 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
 1 5 10 15

033565

Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
 145 150 155 160
 Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
 165 170 175
 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
 180 185 190
 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
 195 200 205
 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220
 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240
 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255
 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
 260 265 270
 Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285
 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300
 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335
 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365
 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380
 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr

<223> «Прямой» праймер для экзона 2 гена CYP82E10

<400> 37
 aggtcgcgct gattcttg 18

<210> 38
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> «Обратный» праймер для экзона 2 гена CYP82E10

<400> 38
 agatgaatac ccatctatct aggagt 26

<210> 39
 <211> 2752
 <212> ДНК
 <213> *Nicotiana tabacum*

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)...(50)
 <223> 5' UTR CYP82E4v2

<220>
 <221> экзон
 <222> (51)...(989)
 <223> Последовательность экзона 1 CYP82E4v2

<220>
 <221> интрон
 <222> (990)...(1990)
 <223> Последовательность интрона CYP82E4v2

<220>
 <221> экзон
 <222> (1991)...(2602)
 <223> Последовательность экзона 2 CYP82E4v2

<220>
 <221> 3'UTR
 <222> (2603)...(2685)
 <223> 3' UTR CYP82E4v2

<400> 39
 aaggaagttg ccgatagtta tattctcaac ttcttatcta aaaatccata atgctttctc 60
 ccatagaagc cattgtagga ctagtaacct tcacatttct cttcttcttc ctatggacaa 120
 aaaaatctca aaaaccttca aaacccttac caccgaaat ccccgagga tggccggtaa 180

tcggccatct tttccacttc aatgacgacg gcgacgaccg tccattagct cgaaaactcg 240
 gagacttagc tgacaaatac ggccccgttt tcacttttctg gctaggcctt ccccttgtct 300
 tagttgtaag cagttacgaa gctgtaaaaag actgtttctc tacaatgac gccatttttt 360
 ccaatcgtcc agcttttctt tacggcgatt accttggcta caataatgcc atgctatttt 420
 tggccaatta cggaccttac tggcgaaaaa atcgaaaatt agttattcag gaagttctct 480
 ccgctagtcg tctcgaaaaa ttcaaacacg tgagatttgc aagaattcaa gcgagcatta 540
 agaatttata tactcgaatt gatggaaatt cgagtacgat aaatttaact gatttggttag 600
 aagaattgaa ttttggctctg atcgtgaaga tgatcgctgg aaaaaattat gaatccggta 660
 aaggagatga acaagtggag agatttaaga aagcgtttaa ggattttatg attttatcaa 720
 tggagtttgt gttatgggat gcatttccaa ttccattatt taaatgggtg gattttcaag 780
 ggcatgttaa ggctatgaaa aggactttta aagatataga ttctgttttt cagaatttgt 840
 tagaggaaca tattaataaa agagaaaaaa tggagggttaa tgcagaaggg aatgaacaag 900
 atttcattga tgtgtgtcct tcaaaaatga gtaatgaata tcttggtgaa ggttactctc 960
 gtgatactgt cattaagca acggtgtttg taagttcatc tgtcattttt catttattca 1020
 cttttatttt gaggagcaga catgttaata ataatttga gcaactgtaa agttatctat 1080
 gtgtacaggt tcgagcctca ggtgcaacca ctaatgcttg tattagatta tgttgtctgc 1140
 atcatacccc taattggagt gtggctcttc ccgaaccctg caatgctgga tgctggatgc 1200
 tttatgtatc agactgacct tttgtttaa ctatctaaat actaaggatg atgatttaat 1260
 aaaaatatag aatggtaaac agaaaaagat gagattattt ttggggctat atggattcgc 1320
 ccgggctttg ggaggtaaaa cggtatctac cagttgagac tttactccag aactttatct 1380
 cgagagctct gaataaaaat gaaatagtat ttaccactcc aaaaactttg atggtaaaaa 1440
 gatgagatat aacctcttat aattgattga accacgttga tagaataaaa cttctttact 1500
 cccattcagc ataagaaaaa tgaaaccaaa cggaaattct ctctttttta gggggaaatt 1560
 ccttaattgc ttgttgaata tagattcatg tcgttattct atttttaata atgatgaaaa 1620
 tcaatatagt caaagttaat acttatgtca tttggtttgc ggacaagtta tattggaact 1680
 atataatacg tctattatag aatagtgatt atttagagga tatacatttt ttttgataa 1740
 atatttgatt tattggatta aaaatagaat atacaggtaa ggtctaaaac gtgtgtttgc 1800
 ttttaccta aataaacttg acctcgtaca attctaagaa aatatttgaa ataaatgaat 1860
 tattttattg ttaatcaatt aaaaaaatca tagtatagat gagatgtgtg catacttgac 1920
 aataactata ctaactaaaa caaggtatgt gaataattga tattcctttt ttaattattc 1980
 tttttccag agtttggtc tggatgcagc agacacagtt gctcttcaca taaattgggg 2040
 aatggcatta ttgataaaca atcaaaaggc cttgacgaaa gcacaagaag agatagacac 2100
 aaaagttggg aaggacaga gggtagaaga gagtgatatt aaggatttgg tatacctcca 2160
 agctattggt aaagaagtgc tacgattata tccaccagga cctttggttag taccacacga 2220
 aaatgtagaa gattgtgttg ttagtgata tcacattcct aaagggacaa gattattcgc 2280
 aaacgtcatg aaactgcaac gtgaccta actctggtct gatcctgata ctttogatcc 2340
 agagagattc attgctactg atattgactt tcgtggctcag tactataagt atatcccgtt 2400
 tggttctgga agacgatctt gtccagggat gacttatgca ttgcaagtgg aaccttaac 2460
 aatggcacat ttgatccaag gtttcaatta cagaactcca aatgacgagc ccttggatat 2520
 gaaggaagggt gcaggcataa ctatacgtaa ggtaaatcct gtggaactga taatagcgc 2580
 tcgctggca cctgagcttt attaaaacct aagatctttc atcttgggtg atcattgtat 2640
 aatactccta aatggatatt catttacctt ttatcaatta attgtcagta cgagtttttc 2700
 taatttggta catttgaat aataagtaaa gaataattgt gctaataatat aa 2752

<210> 40

<211> 2685

<212> ДНК

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)...(30)

<223> 5'UTR CYP82E5v2

<220>

<221> экзон

<222> (31)...(969)

<223> Последовательность экзона 1 CYP82E5v2

<220>

<221> интрон

<222> (970)...(2023)

<223> Последовательность интрона CYP82E5v2

<220>

<221> экзон

<222> (2024)...(2635)

<223> Последовательность экзона 2 CYP82E5v2

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2636)...(2685)

<223> 3'UTR CYP82E5v2

<400> 40

```

gattcccaag ttcttttcta aaactccata atggtttctc cgtagaagc cattgtagga 60
ctagtaacct ttacacttct cttctacttc ctatggccca aaaaatttca aataccttca 120
aaaccattac caccgaaaat tcccgaggg tggccggtaa tcggccatct tttctacttc 180
gatgatgacg gcgacgaccg tocattagct cgaaaactcg gagacttagc tgacaaatac 240
ggcccggttt tcactttccg gctaggcctt ccgcttgtgt tagttgtaag cagttacgaa 300
gctgtaaaaag actgcttctc taaaaatgac gccatthtct ccaatcgtcc agctthtctt 360
tacggtgaat accttggcta cagtaatgcc atgctattht tgacaaaata cggaccttat 420
tggcgaaaaa atagaaaatt agtcattcag gaagttctct ctgctagtcg tctcgaaaaa 480
ttgaagcacg tgagatttgg taaaattcaa acgagcatta agagtttata cactcgaatt 540
gatggaaatt cgagtacgat aaatctaact gattggttag aagaattgaa ttttggctctg 600
atcgtgaaaa tgatcgctgg gaaaaattat gaatccggta aaggagatga acaagtggag 660
agatttagga aagcgtttaa ggattttata atthtataca tggagtttgt gttatgggat 720
gctthtccaa ttccattggt caaatgggtg gattthtcaag gccatgthta ggccatgaaa 780
aggacattta aggatataga ttctgttht cagaattggt tagaggaaca tgtcaagaaa 840
agagaaaaaa tggaggthta tgcacaaggg aatgaacaag atthtattga tgtggtgctt 900
tcaaaaatga gtaatgaata tcttgatgaa ggttactctc gtgatactgt cataaaagca 960
acagtgtttg taagttcatt ttcattthtct attattcagt ctgattthtga ggaatagaca 1020
ggthtaaat aatttaagta attagattat ctaataacta aggatgatta tatatagtaa 1080
aatgtagaa tgataaatg aaaaagatg agaattthtct gtgcctcgac taatctatat 1140

```

```

atctttggga gttaaaagtg cttcaccaaa ggggactttt cctcatagct caagttagaa 1200
gtttgattat agatgaaaga gtatttatca cttcacgaac tctgatgata aaagtaaagt 1260
agatataacc agttataatt gatagaataa aacttcatta ctcccattga gcataaaaaa 1320
aaaagtaaaa gggacttctt ctcttttttt tagggagaaa ttctttaatt gtttgttaaa 1380
tatagattca tgtttttttt ttcttctatt tctaataata atggttcttg aatcaggctg 1440
ttgactttgt agcagcaata tagtcaaagc taatatccat gtattttggt tttcgaacaa 1500
gttatactga aattatatac acgggtatta aataataaca ttattattta taggatatac 1560
tttttttatt gggtaaatat tacaacaaca acaactgact cagtaaaatt ttactagtgg 1620
ggtatgggga gggtagtggt tatgcagacc ttaccctac cccgaaggag tagagggatt 1680
gtttccgaaa gaccctcggc tcaagaaaac aaaaagagac aatatcagta ccaccacaga 1740
tcatattatt aggtaaatgt tttttatttg aattaaagat gaaatataca ggtaagggtat 1800
aaaacgtgta tttgatttta cactagataa atttgacctc gtacatctct aagagaaagc 1860
tgaaataaat gaattttaaa tttaaaaaaa aaattcatta gtataatgag atgtgcatac 1920
ttgacaatta ctatactaaa tagaacaagg ttcggcagat agtgacacta acctactttt 1980
gtattgaatt atccttttta attttattct aattttgtct cagagtttggt tcttggtatg 2040
tgcggacaca gttgctcttc acatgaattg gggaaatggca ttactgataa acaatcaaca 2100
tgccttgaag aaagcacaaag aagagatcga taaaaaagt ggtaaggaaa gatgggtaga 2160
agagagtgat attaaggatt tggctctacct ccaagctatt gttaaagaag tgttacgatt 2220
atatccacca ggacctttat tagtacctca tgaaaatgta gaggattgtg ttgttagtgg 2280
atatcacatt cctaaaggga ctgactatt cgcgaacggt atgaaattgc agcgcgatcc 2340
taaactctgg tcaaatcctg ataagtttga tccagagaga ttcttcgctg atgatattga 2400
ctaccgtggt cagcactatg agtttatccc atttggttct ggaagacgat cttgtccggg 2460
gatgacttat gcattacaag tggaacacct aacaatagca catttgatcc agggtttcaa 2520
ttacaaaact ccaaatgacg agcccttggg tatgaaggaa ggtgcaggat taactatacg 2580
taaagtaaat cctgtagaag tgacaattac ggctcgcctg gcacctgagc tttattaaaa 2640
ccttagatgt tttatcttga ttgtactaat atatatagca gaaaa 2685

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение или часть растения табака, имеющие пониженный уровень содержания норникотина и содержащие мутацию в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E10, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметиразы CYP82E10 в положениях, соответствующих положениям 79, 107, 381 или 419 SEQ ID NO: 2, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- a) замены серином остатка глицина в положении 79;
- b) замены серином остатка пролина в положении 107;
- c) замены серином остатка пролина в положении 381;
- d) замены серином остатка пролина в положении 419 и
- e) любой их комбинации.

2. Растение или часть растения табака по п.1, где указанная никотиндеметиразу CYP82E10 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 5-8 и 9.

3. Растение или часть растения табака по любому из пп.1 или 2, дополнительно включающие мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E4, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 14, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметиразы CYP82E4 в положениях, соответствующих положениям 329, 364, 376, 381 или 458 SEQ ID NO: 14, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- a) замены стоп-кодonom остатка триптофана в положении 329;
- b) замены аспарагином остатка лизина в положении 364;
- c) замены метионином остатка валина в положении 376;
- d) замены серином остатка пролина в положении 381;
- e) замены серином остатка пролина в положении 458 и
- f) любой их комбинации.

4. Растение или часть растения табака по п.3, где указанная никотиндеметиразу CYP82E4 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-19 и 20.

5. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-4, дополнительно содержащие мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E5, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 26, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметиразы CYP82E5 в положениях, соответствующих положениям 422 или 449 SEQ ID NO: 26, и где указанная замена выбрана из группы, со-

стоящей из:

- a) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
- b) замены лейцином остатка пролина в положении 449 и
- c) любой их комбинации.

6. Растение или часть растения табака по п.5, где указанная никотиндемети́лаза CYP82E5 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-31 и 32.

7. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-6, где растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

8. Растение или часть растения табака по п.7, где указанная никотиндемети́лаза CYP82E10 содержит замену аминокислотного остатка в положении, соответствующем положению 381 SEQ ID NO: 2, указанная никотиндемети́лаза CYP82E4 содержит замену аминокислотного остатка в положении, соответствующем положению 329 SEQ ID NO: 14, и указанная никотиндемети́лаза CYP82E5 содержит замену аминокислотного остатка в положении, соответствующем положению 422 SEQ ID NO: 26, где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- a) замены серином остатка пролина в положении 381;
- b) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- v) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422 и
- г) любой их комбинации.

9. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-8, где в указанном растении или его части менее 1,5% никотина превращается в норникотин.

10. Растение или часть растения табака по п.9, где в указанном растении или его части не более 0,5% никотина превращается в норникотин.

11. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-10, где указанное растение табака представляет собой растение темного табака.

12. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-11, где указанное растение табака представляет собой растение, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки или огневой сушки.

13. Растение или часть растения табака по любому из пп.1-10, где указанное растение табака представляет собой Бёрли, Вирджинию или Ориентальный (восточный) табак.

14. Семя растения табака по любому из пп.1-13.

15. Потомство растения табака по любому из пп.1-13.

16. Табачный продукт, изготовленный из растения или части растения табака по любому из пп.1-13.

17. Табачный продукт по п.16, выбранный из группы, состоящей из биоразлагаемого наполнителя, сигареты, сигариллы, невентилируемой сигареты с фильтром, вентилируемой папиросы с фильтром, сигары, трубочного табака, нюхательного табака, жевательного табака, жевательной резинки, пастилки для рассасывания и растворимой пластинки.

18. Способ снижения онкогенного потенциала табачного продукта, включающий приготовление табачного продукта из растения или части растения табака по любому из пп.1-13.

19. Способ снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака, включающий введение мутации в ген никотиндемети́лазы указанного растения или его части, кодирующий никотиндемети́лазу CYP82E10, где указанная никотиндемети́лаза CYP82E10 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндемети́лазы CYP82E10 в положениях, соответствующих положениям 79, 107, 381 или 419 SEQ ID NO: 2, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- i) замены серином остатка глицина в положении 79;
- ii) замены серином остатка пролина в положении 107;
- iii) замены серином остатка пролина в положении 381;
- iv) замены серином остатка пролина в положении 419 и
- v) любой их комбинации.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий введение мутации в ген никотиндемети́лазы указанного растения, кодирующий никотиндемети́лазу CYP82E4, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 14, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндемети́лазы CYP82E4 в положениях, соответствующих положениям 329, 364, 376, 381 или 458 SEQ ID NO: 14, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- i) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- ii) замены аспарагином остатка лизина в положении 364;
- iii) замены метионином остатка валина в положении 376;
- iv) замены серином остатка пролина в положении 381;
- v) замены серином остатка пролина в положении 458 и
- vi) любой их комбинации.

21. Способ по п.19 или 20, дополнительно включающий введение мутации в ген никотиндемети́ла-

зы указанного растения, кодирующий CYP82E5 никотиндеметиразу, аминокислотная последовательность которой по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO: 26, причем указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметиразы CYP82E5 в положениях, соответствующих положениям 422 или 449 SEQ ID NO: 26, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:

- i) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
- ii) замены лейцином остатка пролина в положении 449 и
- iii) любой их комбинации.

22. Способ по любому из пп.19-21, где указанная никотиндеметиразу CYP82E10 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 5-8 и 9.

23. Способ по любому из пп.19-22, в котором указанная никотиндеметиразу CYP82E4 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-19 и 20.

24. Способ по любому из пп.19-23, в котором указанная никотиндеметиразу CYP82E5 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-31 или 32.

25. Способ по любому из пп.19-24, в котором указанное растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

26. Способ по любому из пп.19-25, в котором указанные мутации вводят посредством скрещивания.

27. Способ по любому из пп.19-26, в котором указанное растение табака представляет собой растение темного табака.

28. Способ по любому из пп.19-26, в котором указанное растение табака представляет собой растение, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки или огневой сушки.

29. Способ по любому из пп.19-26, в котором указанное растение табака представляет собой Бёрли, Вирджинию или Ориентальный (восточный) табак.

30. Способ идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, включающий скрининг образца ДНК из представляющего интерес растения табака на присутствие мутации в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E10, раскрытую в любом из пп.1-10, где указанный ген включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или 3.

31. Способ по п.30, в котором указанное растение табака обладает неконвертируемым фенотипом.

32. Способ по п.30 или 31, в котором указанный скрининг осуществляют с использованием последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 35-37 и 38.

33. Способ по любому из пп.30-32, дополнительно включающий скрининг образца ДНК из представляющего интерес растения табака, в отношении присутствия мутации в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E4, определенную в п.3, присутствия мутации в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E5, определенную в п.5, или присутствия комбинации указанных мутаций.

34. Выделенный полипептид никотиндеметиразы CYP82E10, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13;

б) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13; и

в) аминокислотной последовательности, которая представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13, где указанный фрагмент содержит по меньшей мере 115 смежных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 5-12 или 13;

где указанная аминокислотная последовательность содержит мутацию, определенную в п.1.

35. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид по п.34, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

б) нуклеотидной последовательности, которая содержит фрагмент по меньшей мере из 900 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

в) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 98% идентична на всем протяжении последовательности SEQ ID NO: 1;

г) нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности по одному из предыдущих подпунктов (а)-(в),

где нуклеотидная последовательность не кодирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

36. Растение или часть растения табака, гомозиготное/гомозиготная по мутации в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E10, в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E4, и в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E5, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции указанной никотиндеметиразы CYP82E10, CYP82E4 и CYP82E5, где:

а) указанная никотиндеметиразу CYP82E10 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, и указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметиразы CYP82E10 в положениях, соответствующих положениям 79, 107, 381 или 419 SEQ ID NO: 2, и где указанная замена выбрана из группы,

состоящей из:

- i) замены серином остатка глицина в положении 79;
- ii) замены серином остатка пролина в положении 107;
- iii) замены серином остатка пролина в положении 381;
- iv) замены серином остатка пролина в положении 419 и
- v) любой их комбинации;
- б) указанная никотиндеметилаза CYP82E4 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, и указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметилазы CYP82E4 в положениях, соответствующих положениям 329, 364, 376, 381 или 458 SEQ ID NO: 14, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:
 - i) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
 - ii) замены аспарагином остатка лизина в положении 364;
 - iii) замены метионином остатка валина в положении 376;
 - iv) замены серином остатка пролина в положении 381;
 - v) замены серином остатка пролина в положении 458 и
 - vi) любой их комбинации;
- в) указанная никотиндеметилаза CYP82E5 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, и указанная мутация приводит к замене аминокислотного остатка в последовательности никотиндеметилазы CYP82E5 в положениях, соответствующих положениям 422 или 449 SEQ ID NO: 26, и где указанная замена выбрана из группы, состоящей из:
 - i) замены стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
 - ii) замены лейцином остатка пролина в положении 449 и
 - iii) любой их комбинации.

```

1  ttttcaatTTTTgttactTTTTgtatttatcatattattatgcatagccctaaattatccta
261  taaaaaggggaagttggtagatTTTgattcccaagtgcTTTTctaaaaatccataATGGTT
                                         M V 2
121  TCTCCCGTAGAAGCCATCGTAGGACTAGTAACTCTTACACTTCTCTCTACTTCATACGG
    S P V E A I V G L V T L T L L F Y F I R 22
181  ACCAAAAATCTCAAAAACCTTCAAAACCATTACCACCGAAAAATCCCCGGAGGGTGGCCG
    T K K S Q K P S K P L P P K I P G G W P 42
241  GTAATCGGCCATCTTTTCTATTTTCGATGACGACGACGACCGTCCATTAGCAGCAAAA
    V I G H L F Y F D D D S D D R P L A R K 62
301  CTCGGAGACTTAGCTGACAAATACGGCCCGTTTTCACTTTTCGGCTAGGCCTTCCGCTT
    L G D L A D K Y G P V F T F R L G L P L 82
361  GTGTAGTGTGTAAGCAGTTACGAAGCTATAAAAGACTGCTTCTCTACAAATGATGCCATT
    V L V V S S Y E A I K D C F S T N D A I 102
421  TTCTCCAATCGTCCAGCTTTTCTTTATGGCGAATACCTTGGCTACAATAATGCCATGCTA
    F S N R P A F L Y G E Y L G Y N N A M L 122
481  TTTTTGACAAAAATACGGACCTTACTGGCGAAAAATAGAAAAATAGTCAATTCAGGAAGTT
    F L T K Y G P Y W R K N R K L V I Q E V 142
541  CTCTGTGCTAGTCTCTCGAAAAATGAAGCAGGTGAGATTTGGTGAATTCAGACGAGC
    L C A S R L E K L K H V R F G E I Q T S 162
601  ATTAAGAAATTTATACACTCGAATTGATGGAAATTCGAGTACGATAAATCTAACCGATTGG
    I K N L Y T R I D G N S S T I N L T D W 182
661  TTAGAAGAATTGAATTTTGGTCTGATCGTGAAAAATGATCGCTGGGAAAAATTATGAATCC
    L E E L N F G L I V K M I A G K N Y E S 202
721  GGTAAGGAGATGAACAAGTGGAGAGATTTAGGAAAGCGTTTAAGGATTTATAATTTTA
    G K G D E Q V E R F R K A F K D F I I L 222
781  TCAATGGAGTTTGTGTTATGGGATGCTTTTCCAATTCATTGTTCAAAATGGGTGGATTTT
    S M E F V L W D A F P I P L F K W V D F 242
841  CAAGGCCATGTTAAGGCCATGAAAAGCACATTTAAGGATATAGATTCTGTTTTTCAGAAT
    Q G H V K A M K R T F K D I D S V F Q N 262
901  TGGTTAGACGAACATGTCACAAAAAAGAAAAATGGAGGTTAATGCAGAAAGAAATGAA
    W L E E H V K K K E K M E V N A E G N E 282
961  CAAGATTTCAATGATGTTGGTCTTTTCAAAAATGAGTAATGAATATCTTGTGTAAGGCTAC
    Q D F I D V V L S K M S N E Y L D E G Y 302

```

Фиг. 1А

1021 TCTCGTGATACTGTCATAAAAGCAACAGTGTTTgtaagttcatctcatttttcattttatt
S R D T V I K A T V F 313

1081 ctttgaggaatagacagggttaatagtaatttaagtaattagattatctaataactaagga

1141 tgagtaaatatggcaaaaatataagaatgataaatggaaaaggatgataattttttatgcc

1201 cggactaatctaactttgggagttaaagcacttctaccaatagggactttttcttcaagc

1261 tcgatcttgatgaaactctgtggttaaaaaatgagatatanccaattataaattgataga

1321 ataaaacttttattactcccattgagcataacaaaacaaaaaaagtaaaggacttcttc

1381 tcttttttagggagaaattctttgattgtttgttaatatagattcatgttttttttatt

1441 tctaataataattgtgcttgaatcaggtcgcgctgattcttggcttttttagcagcaaatg

1501 agtcaaagctaataatatacatattattttggttttcgaataagttataactgaaattataat

1561 acgggtatataaataataacatgattatttataggatatgctttttttattgggtaaatat

1621 attttttttaattaaaaatgaaatatacaagtaaggataaaaacactatttgattttaca

1681 ctagataaatttgccctcgtacatctctaagagaagagctgaaataaatgaattttaaat

1741 ttcagaaaaaaataaattcattagtataatgagatgtcgatacttgacaattactatact

1801 aactagaacaaggttcagcagatagtgacgctaacctatttttgtattgaattattctaa

1861 tttgtccacagAGTTTAGTCTTGGATGCTGCGGACACAGTTGCTCTTCACATGAATTGGG
S L V L D A A D T V A L H M N W 329

1921 GAATGGCATTATTGATAAAACAATCAACATGCCTTGAAGAAAGCGCAAGAAGAGATAGATA
G M A L L I N N Q H A L K K A Q E E I D 349

1981 AAAAAGTTGGTAAGGATAGATGGGTAGAAGAGAGTGATATTAAGGATTTGGTATACCTCC
K K V G K D R W V E E S D I K D L V Y L 369

2041 AAAC TATTGTAAAGAAGTGTTACGATTATATCCACCGGGACCTTTATTAGTACCCCATG
Q T I V K E V L R L Y P P G P L L V P H 389

2101 AAAATGTAGAGGATTGTGTGTGTAGTGGATATCACATTCCTAAAGGGACTAGACTATTCG
E N V E D C V V S G Y H I P K G T R L F 409

2161 CGAACGTTATGAAATTACAGCGCGATCCTAAACTCTGGTCAAATCCTGATAAGTTCGATC
A N V M K L Q R D P K L W S N P D K F D 429

Фиг. 1Б

2221 CAGAGAGATTTTCGCTGCTGATATTGACTTTTCGTGGTCAACACTATGAGTTTATCCCAT
P E R F F A A D I D F R G Q H Y E F I P 449

2281 TTGGTTCTGGAAGACGATCTTGTCGGGGATGACTTATGCAATGCAAGTGAACACCTAA
F G S G R R S C P G M T Y A M Q V E H L 469

2341 CAATCGCACACTTGATCCAGGTTTCAATTACAAAACCTCAAATGACGAGCCCTTGGATA
T I A H L I Q G F N Y K T P N D E P L D 489

2401 TGAAGGAAGGTGCAGGATTAAC TATACGTAAGGTA AATCCTATAGAAGTGGTAATTACGC
M K E G A G L T I R K V N P I E V V I T 509

2461 CTCGCTGACACCTGAGCTTTATt~~aa~~aatctaagatg~~tt~~tattcttgggtgatcattgtt
P R L T P E L Y 517

2521 taataactcctagatagatgggtattcatctatcttttttaaaattaattgtcagtagcaggt

2581 gtttctaatttggttaagtttgtaacaacaagtaaagaaggattgtgctagtagtga

Фиг. 1В

CYP82E10 aaattatcta taaaagggaa gttggtgata gtttgattcc caagtgtctt tctaaaaatc cataatggit TCTCCGATG AAGCCATCGT AGGACTAGTA 100
 CYP82E5v2 gatttcc caagtctctt tctaaaaatc cataatggit TCTCCGATG AAGCCATCGT AGGACTAGTA
 CYP82E4v2 aaggaa gttgcccata gttatattct caacttctta tctaaaaatc cataatgctt TCTCCATAG AAGCCATGCT AGGACTAGTA 200
 CYP82E10 ACTCTTACAC TTCTCTTCTA CTTCATACGG ACCAAAAAAT CTCAAAAACC TTCAAACCGA TTACCACCGA AATCCCCCG AGGGTGGCCG GTATCTGGCCG
 CYP82E5v2 ACCCTTACAC TTCTCTTCTA CTTCCTATGG CCGAAAAAAT TTCAAARACC TTCAAACCGA TTACCACCGA AATCCCCCG AGGGTGGCCG GTATCTGGCCG
 CYP82E4v2 ACCTTACAT TTCTCTTCTT CTTCCTATGG AGAAAAAAT CTCAAAAACC TTCAAACCGA TTACCACCGA AATCCCCCG AGGATGGCCG GTATCTGGCCG 300
 CYP82E10 ATCTTTTCTA TTTCGATGAC GACGCGGACG ACCGTCACAT AGCACGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACAT TTCGGCTAGG
 CYP82E5v2 ATCTTTTCTA TTTCGATGAT GACGCGGACG ACCGTCACAT AGCTCGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACAT TTCGGCTAGG
 CYP82E4v2 ATCTTTTCTA TTTCATATGAC GACGCGGACG ACCGTCACAT AGCTCGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACAT TTCGGCTAGG 400
 CYP82E10 CTCTCCGCTT GTGTTAGTTG TAAGCAGTTA CGAGCTATA AAGACTGCTT TCTCTACAAA TGATGCCATC TTCTCCAATC GTCCAGCTTT TCTTATGGC
 CYP82E5v2 CTCTCCGCTT GTGTTAGTTG TAAGCAGTTA CGAGCTATA AAGACTGCTT TCTCTACAAA TGATGCCATC TTCTCCAATC GTCCAGCTTT TCTTATGGC
 CYP82E4v2 CTCTCCGCTT GTCTTAGTTG TAAGCAGTTA CGAAGCTATA AAGACTGCTT TCTCTACAAA TGAGGCCATC TTCTCCAATC GTCCAGCTTT TCTTATGGC 500
 CYP82E10 GAATACCTTG GCTACAATAA TGCCATGCTA TTTTGGCAAA AATACGGACC TTAGTGGCGA AAAAATAGAA AATTAGTCAT TCAGGAAGTT CTCCTGGCTA
 CYP82E5v2 GAATACCTTG GCTACAATAA TGCCATGCTA TTTTGGCAAA AATACGGACC TTAGTGGCGA AAAAATAGAA AATTAGTCAT TCAGGAAGTT CTCCTGGCTA
 CYP82E4v2 GATTACCTTG GCTACAATAA TGCCATGCTA TTTTGGCAAA AATACGGACC TTAGTGGCGA AAAAATAGAA AATTAGTCAT TCAGGAAGTT CTCCTGGCTA 600
 CYP82E10 GTGCTCTCGA AAAATTGAAG CACGTGAGAT TTGGTCAAA TCACACGACG ATTAAAGATT TATACACTCG AATTGATGGA AATTCAGATA CGATTAATCT
 CYP82E5v2 GTGCTCTCGA AAAATTGAAG CACGTGAGAT TTGGTCAAA TCACACGACG ATTAAAGATT TATACACTCG AATTGATGGA AATTCAGATA CGATTAATCT
 CYP82E4v2 GTGCTCTCGA AAAATTCAAA CACGTGAGAT TTGCAAGATT TCACACGACG ATTAAAGATT TATATAGTCT AATTGATGGA AATTCAGATA CGATAAATTT 700
 CYP82E10 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTTGG TCGATCTGCT AAAATGATCG CTCGGAAAAA TTATGAATCC GGTAAAGGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTI
 CYP82E5v2 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTTGG TCGATCTGCT AAAATGATCG CTCGGAAAAA TTATGAATCC GGTAAAGGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTI
 CYP82E4v2 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTTGG TCGATCTGCT AAAATGATCG CTCGGAAAAA TTATGAATCC GGTAAAGGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTI 800
 CYP82E10 AGGAAGCGCT TTAAGGATTT TATATTTTAA TCAATGGAGT TTGCTGTTGG GGTATCTTTT CCAATTCATC TGTTCAAATG GGTGGATTTT CAGGGCCATG
 CYP82E5v2 AGGAAGCGCT TTAAGGATTT TATATTTTAA TCAATGGAGT TTGCTGTTGG GGTATCTTTT CCAATTCATC TGTTCAAATG GGTGGATTTT CAGGGCCATG
 CYP82E4v2 AAGAAAGCGT TTAAGGATTT TATATTTTAA TCAATGGAGT TTGCTGTTGG GGTATCTTTT CCAATTCATC TATTAAATG GGTGGATTTT CAGGGCCATG 900
 CYP82E10 TTAAGCCCAT GAAAAGGACA TTTAAGGATA TAGATCTGCT TTTTCAGAAAT TGGTTAGAGG AACATCTCAA GAAAAAGAA AANAATGAGG TTAATTCAGA
 CYP82E5v2 TTAAGCCCAT GAAAAGGACA TTTAAGGATA TAGATCTGCT TTTTCAGAAAT TGGTTAGAGG AACATCTCAA GAAAAAGAA AANAATGAGG TTAATTCAGA
 CYP82E4v2 TTAAGCCCAT GAAAAGGACA TTTAAGGATA TAGATCTGCT TTTTCAGAAAT TGGTTAGAGG AACATATTA TAAAGAGAA AANAATGAGG TTAATTCAGA 1000
 CYP82E10 AGGAATGAAA CAAATTTTCA TTGATGTGGT GCTTCAAAA ATGAGTAAAT AATATCTTGA TGAAGGTTAC TCTCGTATA CTGTCATAAA AGCAACAGTG
 CYP82E5v2 AGGAATGAAA CAAATTTTCA TTGATGTGGT GCTTCAAAA ATGAGTAAAT AATATCTTGA TGAAGGTTAC TCTCGTATA CTGTCATAAA AGCAACAGTG
 CYP82E4v2 AGGAATGAAA CAAATTTTCA TTGATGTGGT GCTTCAAAA ATGAGTAAAT AATATCTTGA TGAAGGTTAC TCTCGTATA CTGTCATAAA AGCAACAGTG

Фиг. 2А

CYP82E10 TTtTgaagtt catct..cat ttttcattt. at...tct.. ..ttgaggaa tagacaggtt aatagtaatt ta.agtaa.. ttagattat ctaaatacta 1100
 CYP82E5v2 TTtTgaagtt cattt..tcat ttttcatta. ttcagtctga tttttaggaa tagacaggtt aatagtaatt ta.agtaa.. ttagattat ctaaatacta
 CYP82E4v2 TTtTgaagtt catctgtcat ttttcattta ttcacttita tttttagagg tagacaggtt aatagtaatt tggagcaact gtaaagttat ctatgtgtac 1200
 CYP82E10 aggatagata aatatggcaa aatatagaaa tgataaatgg aaaag.gatg afaatttttt atgcccggac taatctaa.. .ctttggga gttaaa.gca
 CYP82E5v2 aggatagata tatatagtaa aatagttagaa tgataaatgg aaaaaagatg agaaatttttt gtgctctgac taatctaat atctttggga gttaaaagtg
 CYP82E4v2 aggtt.cgag cctcaggtgc aaccactaat gcttgtatta gattatgttt cctgcacat ac.cctaat tggagcttgg accttcccga acct..gra 1300
 CYP82E10 ctctctacac atagggactt tcttctca.ag cttega.... t ctctgatgaaa ctctgtggt taaaa..aaa
 CYP82E5v2 ctctc..acca aaggggactt tctctctag ctcaagttag aagtttggat atagatgaaa gagtatttat cacttcaaga actctgatga taaaagtaaa
 CYP82E4v2 atgctggatg ctggatgctt tatgtatcag actgac.... ctt tctgttaaac tatctaaata ctaaggatga 1400
 CYP82E10 tgegata.ca acccaattata dltgatagaa taaaacttta ttaactccat tggactatac aaaaacaaaa aaagtaaggg gacttcttct cttttt..a
 CYP82E5v2 tgegata.ta acccattata atgatagaa taaaacttca ttaactccat tggactatac aaaaaagta aaag....g gacttcttct cttttttta
 CYP82E4v2 tgatttaata aaaaatagaa atgtaaaaca gaaaaagatg agattattt tggggctata tggattcgcc cgggctttgg gaggtaaaac ggtatctacc 1500
 CYP82E10 gggagaatt ctttgattgt ttgttaa.ta tagattcatg tttttttt.attc taataataat tgtgctgaa ttaggtgag ctgattcttg
 CYP82E5v2 gggagaatt ctttaattgt ttgttaaata tagattcatg tttttttt cttctatttc taataataat ggttctgaa ttaggtgagttg
 CYP82E4v2 agttgagact ttaactcaga accttatctc gagagctctg aataaaaafg aaatagtatt taccactca aactcttga tggtaaaaag atgagatafa 1600
 CYP82E10 gcttlttagc agcaatagag tcaaa..gct aatatacata ttatttgggt ttcgataaag ttatactgaa attatataat acgggtatta aataataaca
 CYP82E5v2 actttgttagc agcaatagag tcaaa..get aatatacata ttatttgggt ttcgataaag ttatactgaa attatata i acgggtatta aataataaca
 CYP82E4v2 acttcttata attgattgaa cbcggtgat agaaataaac ttctta..c cccatctag cataagaaaa atgaaaccaa acgg....a attctctct 1700
 CYP82E10 tgatttata taggatatgc ttttttatt gggtaaatat cagbaaaatt ttaactgtgg ggtatgggga ggttagtgtg
 CYP82E5v2 ttaattatta taggatatac ttttttatt gggtaaatat tacaacaaca acaactgac ttaactgtgg ggtatgggga ggttagtgtg
 CYP82E4v2 ttttta..g ggggaaattc ctttaattgct tgttaaatat agattctatg cg.....t tttctattt ttaataatga tgaaaatcaata 1800
 CYP82E10 a.tttttt taattaaaaa tgaatatac aagtaaggt taaaacac.t atttgatttt gactagata aatttgcct
 CYP82E5v2 ccatattatt aggtaaatgt ta.ttttatt gaattaaaga tgaatatac aagtaaggt taaaacgtgt atttgatttt acactagata aatttgcct
 CYP82E4v2 cattttttt ggtataaatat ttgatttatt ggttaaaaaa tagaataaac aagtaaggtc taaaacgtgt gtttgccttt acactaaata aacttgcct 2000
 CYP82E10 cytacatctc taagagaaga gctgaaatea atgaatt... ttaaatctca gaaaaaaa aattcattag tataatgaga tgc..gata cttgacaatt
 CYP82E5v2 cytacatctc taagaga.a gctgaaatea atgaatt... ttaaatctca gaaaaaaa aattcattag tataatgaga tgc..cata cttgacaatt
 CYP82E4v2 cytacaatbc taagaaaata ttgaaataa atgaattatt ttattgttaa tcaattaaa aatcatag atagatgaga tgtgtgata cttgacaata

Фиг. 2Б

2100
 CYP82E10 actatactaa ctagaacaag gttcagcaga tagtgcgct aacctatfff tgtattgaaat tat.....tc taattgtctc acagagTTTA
 CYP82E5v2 actatactaa atagaacaag gttcggcaga tagtgcact aacctatfff tgtattgaaat tatccttttt aattttatc taattgtctc acagagTTTG
 CYP82E4v2 actatactaa ctaaaacaag gtatgtgaat aattgatatt ..cctfffftaat tat.....tc tttttt... ccagagTTTG

2200
 CYP82E10 GTCTTGGATG CTGCGGACAC AGTTGCTCTT CACATGAATT GGGGAATGGC ATTATTGATA AACAAATCAAC ATGCOCTTGA GAAAGCGCAA GAAGAGATAG
 CYP82E5v2 GTCTTGGATG CTGCGGACAC AGTTGCTCTT CACATGAATT GGGGAATGGC ATTACTGATA AACAAATCAAC ATGCOCTTGA GAAAGCGCAA GAAGAGATCG
 CYP82E4v2 GTCTTGGATG CAGCAGACAC AGTTGCTCTT CACATAAATT GGGGAATGGC ATTATTGATA AACAAATCAA AGGCOCTTGA GAAAGCGCAA GAAGAGATAG

2300
 CYP82E10 ATAAAAAGT TGGTAAGGAT AGATGGGTAG AGAGAGCTGA TATTAAGGAT TTGGTATACC TCCAAACTAT TGTAAAGAA GTGTACGAT TATATCCACC
 CYP82E5v2 ATAAAAAGT TGGTAAGGAA AGATGGGTAG AGAGAGCTGA TATTAAGGAT TTGGTATACC TCCAAACTAT TGTAAAGAA GTGTACGAT TATATCCACC
 CYP82E4v2 ACACAAAAGT TGGTAAGGAC AGATGGGTAG AAGAGAGTGA TATTAAGGAT TTGGTATACC TCCAAACTAT TGTAAAGAA GTGTACGAT TATATCCACC

2400
 CYP82E10 GGGACCTTAA TTAGTACCC ATGAAAATGT AGAGGATGT GTTGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACTAGACTAT TCGCAACGT TATGAAATTA
 CYP82E5v2 AGGACCTTAA TTAGTACCT ATGAAAATGT AGAGGATGT GTTGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACTAGACTAT TCGCAACGT TATGAAATTTG
 CYP82E4v2 AGGACCTTTG TTAGTACCAC ACGAAAATGT AGAGGATGT GTTGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACAAGATTAT TCGCAACGT CATGAACTG

2500
 CYP82E10 CAGCCGCGATC CTAACACTCTG GTCAAATCCT GATAAGTTCG ATCCAGAGAG AETTTGGCT GGTGATATTG ACTTTCGTGG TCAACACTAT GAGTTTATCC
 CYP82E5v2 CAGCCGCGATC CTAACACTCTG GTCAAATCCT GATAAGTTCG ATCCAGAGAG AETTTGGCT GATGATATTG ACTACCGTGG TCACCACTAT GAGTTTATCC
 CYP82E4v2 CAGCGTATAC CTAACACTCTG GTCTGATCCT GATACTTTCG ATCCAGAGAG AETTTGGCT ACTGATATTG ACTTTCGTGG TCAGTACTAT AAGTATATCC

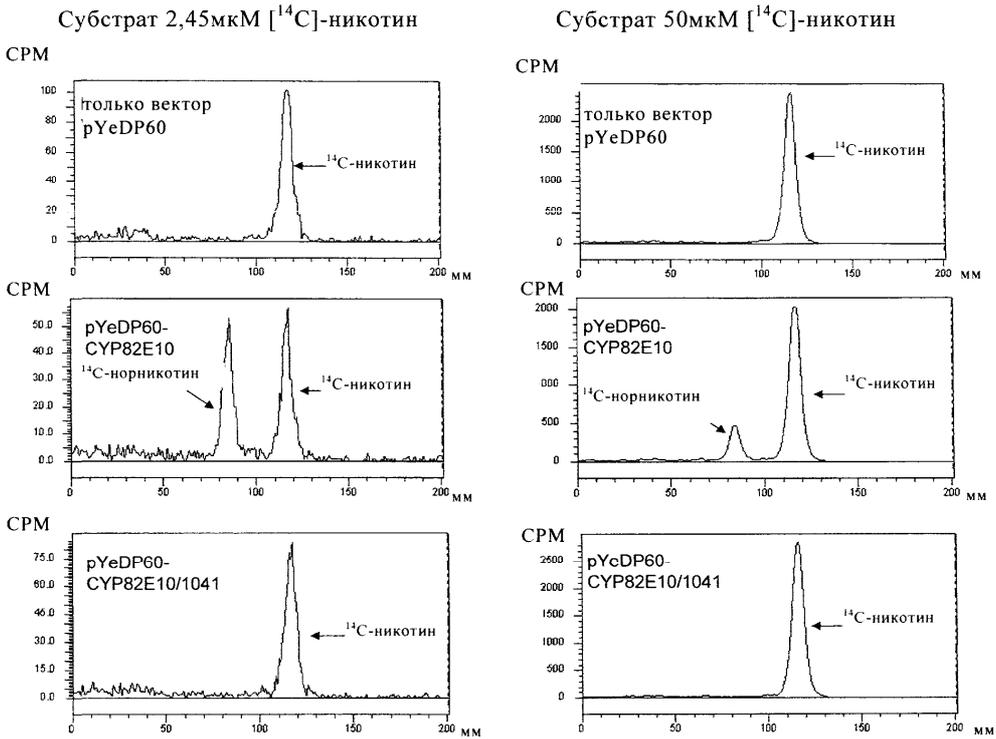
2600
 CYP82E10 GATTTCGCTC TGGAGACGA TCTTGTCCGG GGTGACCTTA TGCATGCAA GTGCAACACC TAACAATCGC ACACTTGCAT CAGGCTTTCG ATTACAAAAC
 CYP82E5v2 GATTTCGCTC TGGAGACGA TCTTGTCCGG GGTGACCTTA TGCATGCAA GTGCAACACC TAACAATAGC ACACTTGCAT CAGGCTTTCG ATTACAAAAC
 CYP82E4v2 GATTTCGCTC TGGAGACGA TCTTGTCCGG GGTGACCTTA TGCATGCAA GTGCAACACC TAACAATCGC ACACTTGCAT CAGGCTTTCG ATTACAAAAC

2700
 CYP82E10 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAAGG AGTTCGAGGA TTAACATATC GTTAACTAAA TCCTATAGAA GTGTAATTA CGCCTCGCCT GAGCCTGAG
 CYP82E5v2 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAAGG AGTTCGAGGA TTAACATATC GTTAACTAAA TCCTGTAGAA GTGCAATTA CGCCTCGCCT GGCACCTGAG
 CYP82E4v2 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAAGG AGTTCGAGCC ATAACTATAC GTTAACTAAA TCCTGTGAA CTGATAATAG CGCCTCGCCT GGCACCTGAG

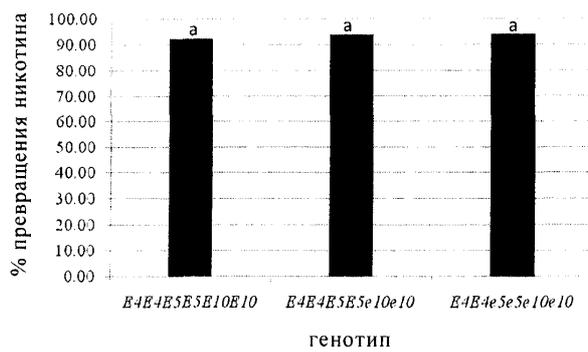
2800
 CYP82E10 CTTATATAA atctaagatg ttttatcttg gttgatcatt gtttaatact cctagataga tgggatttca tctatctttt taaaattaat tgtcagtagc
 CYP82E5v2 CTTATATAA accttagatg ttttatcttg attgtac. c aatataata ccgaaag.....
 CYP82E4v2 CTTATATAA acctaagatc ttttatcttg gttgaccate gtataatact cctaaa... tgggatttca tttacctttt atcaattaat tgtcagtagc

2860
 CYP82E10 agtgtttcta atttggtaag tttgtaacaa caagttaaga aggattgtgc tagtatgta.
 CYP82E5v2 agtgtttcta atttggtaag tttgtaacaa caagttaaga ataattgtgc taatataata
 CYP82E4v2 agtgtttcta atttggtaag tttgtaacaa taagttaaga ataattgtgc taatataata

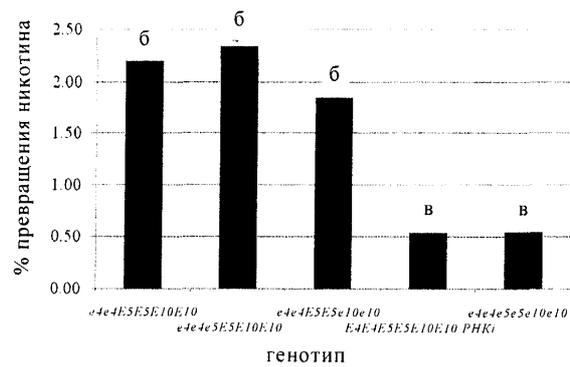
Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4Б