

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035528**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.30

(21) Номер заявки
201790841

(22) Дата подачи заявки
2015.09.30

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(54) ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЕРБИЦИДАМ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/064,343**

(32) **2014.10.15**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/053123**

(87) **WO 2016/060843 2016.04.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС
(US)**

(72) Изобретатель:
**Эллис Кристин М., Евдокимов Артем
Дж., Фэн Пол К.К., Фу Сяожань, Лару
Клейтон Т., Наджеотт Джеффри Р.,
Рид Эндрю К., Ши Лэй, Уоллекотт
Эндрю М. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2005107437**

SCHLEINITZ, K.M. et al. Localization And Characterization Of Two Novel Genes Encoding Stereospecific Dioxygenases Catalyzing 2-(2,4-Dichlorophenoxy)Propionate Cleavage In *Delftia Acidovorans* MC1. *Appl Environ Microbiol.* September 2004, Vol. 70, No. 9; pages 5357-5365; first Genbank reference, pages 1-2; second Genbank Supplement, pages 1-4; DOI: 10.1128/AEM.70.9.5357-5365.2004

MULLER, T.A. et al. Genetic Analysis Of Phenoxyalkanoic Acid Degradation In *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl Environ Microbiol.* October 2004, Vol. 70, No. 10; pages 6066-6075; DOI: 10.1120/ACM.70.10.0000-0075.2004

WRIGHT, T.R. et al. Robust Crop Resistance To Broadleaf And Grass Herbicides Provided By Aryloxyalkanoate Dioxygenase Transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 23 November 2010, Vol. 107, No. 47; pages 20240-20245; DOI: 10.1073/pnas.1013154107

US-A1-20110124503

(57) В изобретении предлагаются полипептиды и рекомбинантные молекулы ДНК, полезные для придания устойчивости к гербицидам на основе АОФП, гербицидам на основе феноксикислот и гербицидам на основе пиридининоксикислот, и также устойчивые к гербицидам трансгенные растения, семена, клетки и части растений, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК, а также способы их применения.

B1**035528****035528****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/064343, поданной 15 октября 2014 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Включение перечня последовательностей

Перечень последовательностей, который содержится в файле под названием "MONS378WO_ST25", который имеет размер 118,364 байт (измерено в MS-WINDOWS) и который был создан 25 сентября 2015 г., подается в данном документе в электронной форме и включен в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к области биотехнологии. Более конкретно изобретение относится к рекомбинантным молекулам ДНК, кодирующим ферменты, которые вызывают разрушение гербицидов. Изобретение также относится к трансгенным растениям, частям, семенам, клеткам и частям растений, содержащим рекомбинантные молекулы ДНК, а также способам их применения.

Описание уровня техники

В производстве сельскохозяйственных культур часто используется трансгенные признаки, созданные с помощью способов биотехнологии. Гетерологичный ген, также известный как трансген, вводится в растение для получения трансгенного признака. Экспрессия трансгена в растении дает желаемый признак, такой как устойчивость к гербициду, по всему растению. Примеры трансгенных признаков устойчивости к гербицидам включают устойчивость к глифосату, устойчивость к глюфосинату и устойчивость к дикамба. С увеличением количества видов сорняков, резистентных к наиболее часто применяемым гербицидам, в поле необходимы новые признаки устойчивости к гербицидам. Гербициды, представляющие особый интерес, являются собой гербициды на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербициды на основе феноксикислот и гербициды на основе пиридинилюксикислот. Гербициды на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербициды на основе феноксикислот и гербициды на основе пиридинилюксикислот обеспечивают контроль над спектром устойчивых к глифосату сорняков, тем самым делая признак, придающий устойчивость к этим гербицидам, особенно полезным в системе растениеводства в сочетании с другим признаком(ами) устойчивости к гербициду(дам).

Штамм *MH Sphingobium herbicidovorans*, выделенный из образца грунта, разрушающего дихлорпроп, был идентифицирован как способный расщеплять эфирные связи различных феноксикалкановых кислот и гербицидов, используя их в качестве единственного источника углерода и энергии для роста (HPE Kohler, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1999) 23:336-340). Катаболизм гербицидов осуществляют две различные энантиоселективные α -кетоглутаратзависимые диоксигеназы, RdpA (R-дихлорпропдиоксигеназа) и SdpA (S-дихлорпропдиоксигеназа). (A. Westendorf, et al., *Microbiological Research* (2002) 157:317-322; Westendorf, et al., *Acta Biotechnologica* (2003) 23(1):3-17). RdpA был изолирован из *Sphingobium herbicidovorans* (номер доступа ГенБанка AF516752 (ДНК) и AAM90965 (белок)) и *Delftia acidovorans* (номер доступа ГенБанка NG_036924 (ДНК) и YP_009083283 (белок)) (TA Mueller, et al., *Applied and Environmental Microbiology* (2004) 70 (10):6066-6075). Чтобы придать культурам устойчивость к гербицидам для трансформации растений были использованы гены RdpA и SdpA (T.R. Wright, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, (2010) 107 (47):20240-5). Повышение активности фермента RdpA с применением технологий белковой инженерии с целью создания белка для использования в трансгенных растениях, позволило бы повысить нормы применения гербицидов, таким образом улучшив безопасность трансгенных культур и меры борьбы с сорняками.

Краткое описание сущности изобретения

В изобретении предложен полипептид, который имеет по меньшей мере около 92% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52. В одном варианте реализации изобретения полипептид имеет оксигеназную активность против по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилюксикислот.

В изобретении предложена рекомбинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который имеет по меньшей мере около 92% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 и 53-59. В другом варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК кодирует полипептид с оксигеназной активностью против по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилюксикислот. В другом варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК функционально связана с гетерологичным промотором, который функционирует в растительной клетке. В другом варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК функционально связана с молекулой ДНК, кодирующей транзитный пептид хлоро-

пласта, функция которого заключается в локализации функционально связанного полипептида внутри клетки.

В изобретении предложена ДНК-конструкция, содержащая гетерологичный промотор, который функционирует в растительной клетке и функционально связан с рекомбинантной молекулой ДНК, кодирующей полипептид, который имеет по меньшей мере около 92% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК функционально связана с молекулой ДНК, кодирующей транзитный пептид хлоропласта, функция которого заключается в локализации функционально связанного полипептида внутри клетки. В другом варианте реализации изобретения рекомбинантная молекула ДНК кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52, и экспрессия полипептида в трансгенном растении придает растению устойчивость к гербицидам. В другом варианте реализации изобретения ДНК-конструкция присутствует в геноме трансгенного растения.

В изобретении предложено трансгенное растение, семя, клетка или часть растения, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который имеет по меньшей мере около 92% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52. В одном варианте реализации изобретения трансгенное растение, семя, клетка или часть растения содержит трансгенный признак устойчивости по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилоксикислот. В другом варианте реализации изобретения трансгенное растение, семя, клетка или часть растения содержит ДНК-конструкцию согласно данному изобретению. В другом варианте реализации изобретения трансгенное растение, семя, клетка или часть растения содержит полипептид согласно данному изобретению.

В изобретении предложен способ придания растению, семени, клетке или части растения устойчивости к гербицидам, включающий экспрессию полипептида согласно изобретению в растении, семени, клетке или части растения. В одном варианте реализации изобретения, способ придания устойчивости к гербицидам применяется к трансгенному растению, семени, клетке или части растения, что содержат трансгенный признак, содержащие рекомбинантную молекулу ДНК согласно изобретению. В одном варианте реализации изобретения способ придания устойчивости к гербицидам применяется с гербицидом, выбранным из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

В изобретении предложен способ трансформации растения, включающий введение ДНК-конструкции согласно изобретению в растительную клетку и регенерацию из нее растения, которое содержит ДНК-конструкцию и которое устойчиво по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилоксикислот. В одном варианте реализации изобретения способ трансформации растения включает скрещивание регенерированного растения с самим собой или со вторым растением и сбор семян гибрида.

В изобретении предложен способ контроля сорняков в области произрастания растений путем воздействия на область произрастания растений, содержащую трансгенное растение или семя согласно изобретению, по меньшей мере одним гербицидом, выбранным из группы, состоящей из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилоксикислот, при этом трансгенное растение или семя устойчиво к гербициду.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - контрольные и MON-HT55 (SEQ ID NO: 11) трансгенные растения кукурузы после обработки квизалофопом-П. На фиг. 1А проиллюстрированы контрольные и трансгенные растения кукурузы, которые либо необработанны, либо обработаны 1X квизалофопом-П (0,08 фунта д.в./акр). На фиг. 1Б проиллюстрированы гибридные контрольные растения кукурузы F1, а на фиг. 1В проиллюстрированы гибридные трансгенные растения кукурузы MON-HT55 F1. Растения выращивали при дневных/ночных температурах, равных (1) 20°C/20°C, (2) 28°C/20°C или (3) 38°C/30°C перед опрыскиванием 2X квизалофопом-П.

Фиг. 2 - графики, показывающие зависимость активности сконструированных белков от температуры. На фиг. 2А проиллюстрирована активность фермента RdpA MON-HT55 (SEQ ID NO: 11) и фермента RdpA дикого типа при тестировании с применением квизалофоп-П в качестве субстрата. На фиг. 2Б проиллюстрирована активность RdpA MON-HT1 (SEQ ID NO: 14), MON-HT2 (SEQ ID NO: 18), MON-HT7 (SEQ ID NO: 34), MON-HT8 (SEQ ID NO: 37) и RdpA дикого типа при тестировании с применением квизалофоп-П в качестве субстрата. На фиг. 2В проиллюстрирована активность RdpA MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7, MON-HT8 и RdpA дикого типа при тестировании с применением 2,4-D в качестве субстрата. Данные нормированы к активности каждого белка при 25°C.

Фиг. 3 - белковая последовательность RdpA дикого типа (SEQ ID NO: 60) с иллюстративными по-

ложениями аминокислот, пригодными для белковой инженерии, которые обозначены квадратами.

Фиг. 4 - средняя оценка травматизма после применения 2X квизалофопа-П (0,16 фунта д.в./акр) (4А, 4Б и 4В) или 4Х 2,4-D (4 фунта д.в./акр) (4Г и 4Д) к F1 гибридным растениям кукурузы (инбредные гомозиготные R1 экспрессирующие MON-HT x MON89034), экспрессирующим MON-HT55 (SEQ ID NO:11), MON-HT1 (SEQ ID NO:14), MON-HT2 (SEQ ID NO:18), MON-HT3 NO:22), MON-HT4 (SEQ ID NO:25), MON-HT7 (SEQ ID NO:34) или к F1 гибриднему контролю (NK603 x MON89034). Данные, полученные на растениях, адаптированных к дневным и ночным температурам, установленным на уровне 20°C (20°C/20°C) перед нанесением 2Х квизалофопа-П (фиг. 4А) или 4Х 2,4-D (фиг. 4Г); на фиг. 4Б проиллюстрированы данные, полученные на растениях, адаптированных при дневной температуре 28°C и ночной температуре 20°C (28°C/20°C) перед нанесением 2Х квизалофопа-П; на фиг. 4В проиллюстрированы данные, полученные на растениях, акклиматизированных при дневной температуре 38°C и ночной температуре 30°C (38°C/30°C) перед нанесением 2Х квизалофопа-П (фиг. 4В) или 4Х 2,4-D (фиг. 4Д).

Фиг. 5А и 5Б - контрольные и трансгенные растения кукурузы, содержащие MON-HT2 (SEQ ID NO: 20, кодирующая SEQ ID NO: 18), с ТПХ или без ТПХ, где растения получали квизалофоп-П в 16Х нормах (1,28 фунта д.в./акр), примененных на V2, после чего следовало применение на V4, и фотографии, сделанные через 10-14 дней после применения квизалофопа-П.

Фиг. 6А-6Д - множественное выравнивание белковых последовательностей для RdpA дикого типа из *S.herbicidovorans* (SEQ ID NO: 60) и SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52 с консенсусной последовательностью (представленной в виде SEQ ID NO: 61), представленной в нижней части каждой из фиг. 6А, 6Б, 6В, 6Г, 6Д.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1-3 представляют собой последовательности MON-HT51: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 4-6 представляют собой последовательности MON-HT52: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 7-8 представляют собой последовательности MON-HT53: аминокислотную последовательность и полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами.

SEQ ID NO: 9-10 представляют собой последовательности MON-HT54: аминокислотную последовательность и полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами.

SEQ ID NO: 11-13 представляют собой последовательности MON-HT55: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 14-17 представляют собой последовательности MON-HT1: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами двудольных.

SEQ ID NO: 18-21 представляют собой последовательности MON-HT2: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами двудольных.

SEQ ID NO: 22-24 представляют собой последовательности MON-HT3: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 25-27 представляют собой последовательности MON-HT4: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 28-30 представляют собой последовательности MON-HT5: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 31-33 представляют собой последовательности MON-HT6: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 34-36 представляют собой последовательности MON-HT7: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 37-39 представляют собой последовательности MON-HT8: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 40-42 представляют собой последовательности MON-HT9: аминокислотную последовательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 43-45 представляют собой последовательности MON-HT10: аминокислотную последо-

вательность, полинуклеотидную последовательность с бактериальными кодонами и оптимизированную полинуклеотидную последовательность с кодонами однодольных.

SEQ ID NO: 46-52 представляют собой аминокислотные последовательности MON-HT11, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15, MON-HT16, MON-HT17 и MON-HT18.

SEQ ID NO: 53-59 представляют собой полинуклеотидные последовательности MON-HT11, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15, MON-HT16, MON-HT17 и MON-HT18 с оптимизированным кодонами двудольных.

SEQ ID NO: 60 представляет собой аминокислотную последовательность для RdpA дикого типа из *Sphingobium herbicidovorans*.

SEQ ID NO: 61 представляет собой консенсусную последовательность фиг. 6А-6Д.

Подробное описание сущности изобретения

Следующие определения и способы предложены для того, чтобы лучше определить настоящее изобретение и направить среднего специалиста в данной области техники в практическом подходе по настоящему изобретению. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии с обычным применением средними специалистами в данной области техники.

Изобретение устраняет ограничения предшествующего уровня техники путем предоставления новых, сконструированных белков, называемых в данном документе белками MON-HT, и рекомбинантных молекул ДНК, которые их кодируют, а также композиций и способов их применения. Белки MON-HT представляют собой оксигеназы, которые могут инактивировать гербициды на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербициды на основе феноксикислот и гербициды на основе пиридининоксикислот. Применяемый в данном документе термин "инактивация гербицида" означает, что гербицид больше не обладает гербицидной активностью против растения. Белки MON-HT проявляют новую субстратную селективность, полезную ферментативную кинетику и большую стабильность фермента при повышенной температуре. Трансгенные растения, экспрессирующие белок MON-HT, демонстрируют более высокую устойчивость к воздействию гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридининоксикислот.

Сконструированные белки и рекомбинантные молекулы ДНК.

В изобретении предложены новые сконструированные белки и рекомбинантные молекулы ДНК, которые их кодируют. Применяемый в данном документе термин "сконструированный" относится к искусственным ДНК, белку или организму, которые обычно не встречаются в природе и которые были созданы путем человеческого вмешательства. "Сконструированный белок" представляет собой белок, полипептидная последовательность которого была задумана и создана в лаборатории с применением одного или нескольких методов белковой инженерии, таких как дизайн белка с использованием сайт-направленного мутагенеза и направленной эволюции с применением случайного мутагенеза и перетасовки ДНК. Например, сконструированный белок может иметь одну или более делеций, вставок или замещений относительно кодирующей последовательности белка дикого типа, и каждая делеция, инсерция или замена может состоять из одной или более аминокислот. Примеры сконструированных белков представлены в данном документе как SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52.

Сконструированные белки, предложенные в настоящем изобретении, представляют собой ферменты, которые обладают оксигеназной активностью. Как применяется в данном документе, термин "оксигеназная активность" означает способность окислять субстрат путем переноса кислорода из молекулярного кислорода на субстрат, побочный продукт или промежуточный продукт. Оксигеназная активность сконструированных белков, предложенных в изобретении, может инактивировать один или более из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридининоксикислот.

Как применяется в настоящем документе, термин "дикий тип" означает естественно встречающийся. Как применяется в настоящем документе, "молекула ДНК дикого типа", "полипептид дикого типа" или "белок дикого типа" представляет собой естественно встречающуюся молекулу ДНК, полипептид или белок, т.е. молекулу ДНК, полипептид или белок, ранее существовавший в природе. Вариант полипептида, белка или молекулы ДНК дикого типа может быть полезным для сравнения с сконструированным белком или геном. Примером белка дикого типа, пригодного для сравнения с сконструированными белками, предложенными в настоящем изобретении, является фермент RdpA из штамма МН *Sphingobium herbicidovorans*. Примером молекулы ДНК дикого типа, пригодной для сравнения с рекомбинантными молекулами ДНК, предложенными в настоящем изобретении, является ген RdpA из штамма МН *Sphingobium herbicidovorans*. Вариант белка или молекулы ДНК дикого типа может быть полезным в качестве контроля в эксперименте.

Как применяется в данном документе, термин "контроль" означает экспериментальный контроль, предназначенный для целей сравнения. Например, контрольное растение в анализе трансгенных растений представляет собой растение того же типа, что и экспериментальное растение (тестируемое растение), но не содержит трансгенной вставки, рекомбинантной молекулы ДНК или ДНК-конструкции экспериментального растения. Примером контрольного растения, пригодного для сравнения с трансгенными растениями кукурузы, является нетрансгенная кукуруза LH244 (патент США № 6252148), и с транс-

генными растениями сои является нетрансгенная соя A3555 (патент США № 7700846).

Как применяется в настоящем документе, термин "рекомбинантный" относится к искусственным ДНК, полипептиду или белку, который(ая) является результатом генной инженерии и как таковой(ая) обычно не встречается в природе, и который(ая) был создан в результате вмешательства человека. "Рекомбинантная молекула ДНК" представляет собой молекулу ДНК, содержащую последовательность ДНК, которая не встречается в естественной среде, и как таковая является результатом вмешательства человека, например молекула ДНК, которая кодирует сконструированный белок. Другим примером является молекула ДНК, состоящая из комбинации по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных друг другу, таких как кодирующая белок молекула ДНК и функционально связанный гетерологичный промотор. Примером рекомбинантной молекулы ДНК является молекула ДНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 и 53-59. "Рекомбинантный полипептид" или "рекомбинантный белок" представляет собой полипептид или белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая не встречается в естественной среде и как таковая является результатом вмешательства человека, например, сконструированный белок.

Термин "трансген" относится к молекуле ДНК, искусственно встраиваемой в геном организма в результате вмешательства человека, например, способами трансформации растений. Как применяется в настоящем документе, термин "трансгенный" означает содержащий трансген, например, "трансгенное растение" относится к растению, содержащему трансген в его геноме, а "трансгенный признак" относится к характеристике или фенотипу, который(ая) передается или обеспечивается наличием трансгена, что встроено в геном растения. В результате такого геномного изменения трансгенное растение является чем-то сильно отличающимся от родственного растения дикого типа, а трансгенный признак является признаком, не встречающимся в естественной среде в растении дикого типа. Трансгенные растения, согласно данному изобретению, содержат рекомбинантную молекулу ДНК и сконструированные белки, предложенные в изобретении.

Как применяется в настоящем документе, термин "гетерологичный" относится к взаимосвязи между двумя или более вещами, которые получены из разных источников и, таким образом, обычно не связаны в природе. Например, белок-кодирующая рекомбинантная молекула ДНК является гетерологичной по отношению к функционально связанному промотору, если такая комбинация обычно не встречается в природе. Кроме того, конкретная рекомбинантная молекула ДНК может быть гетерологичной по отношению к клетке или организму, в который она вставлена, когда она не будет встречаться в естественной среде в этой конкретной клетке или организме.

Как применяется в настоящем документе, термин "молекула ДНК, кодирующая белок" или "молекула ДНК, кодирующая полипептид" относится к молекуле ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок или полипептид. "Белок-кодирующая последовательность" или "полипептид-кодирующая последовательность" означает последовательность ДНК, которая кодирует белок или полипептид. "Последовательность" означает последовательное расположение нуклеотидов или аминокислот. Границы белок-кодирующей последовательности или полипептид-кодирующей последовательности обычно определяются стартовым кодоном трансляции на 5'-конце и стоп-кодоном трансляции на 3'-конце. Белок-кодирующая молекула или полипептид-кодирующая молекула может содержать последовательность ДНК, кодирующую белковую или полипептидную последовательность. Как применяется в настоящем документе, термин "экспрессия трансгена", "экспрессирование трансгена", "экспрессия белка", "экспрессия полипептида", "экспрессирование белка" и "экспрессирование полипептида" означает продуцирование белка или полипептида в процессе транскрипции молекулы ДНК в матричную РНК (мРНК) и трансляции мРНК в полипептидные цепи, которые могут быть в конечном счете свернуты в белки. Белок-кодирующая молекула ДНК или полипептид-кодирующая молекула ДНК, может быть функционально связана с гетерологичным промотором в ДНК-конструкции, для применения в экспрессии белка или полипептида в клетке, трансформированной рекомбинантной молекулой ДНК. Как применяется в настоящем документе, термин "функционально связанный" означает две молекулы ДНК, связанные таким образом, что одна молекула может влиять на функцию другой. Функционально-связанные молекулы ДНК могут быть частью одной непрерывной молекулы и могут быть или не быть смежными. Например, промотор функционально связан с белок-кодирующей молекулой ДНК или полипептид-кодирующей молекулой ДНК в ДНК-конструкции, где две молекулы ДНК расположены таким образом, что промотор может влиять на экспрессию трансгена.

Как применяется в настоящем документе, "ДНК-конструкция" представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую две или более гетерологичных последовательности ДНК. Конструкции ДНК полезны для экспрессии трансгена и могут быть включены в векторы и плазмиды. Конструкции ДНК могут быть применены в векторах с целью трансформации, что представляет собой введение гетерологичной ДНК в клетку-хозяина для получения трансгенных растений и клеток, и как таковые могут также содержаться в плазмидной ДНК или геномной ДНК трансгенных растений, семени, клетки или части растения. Как применяется в настоящем документе, термин "вектор" означает любую рекомбинантную молекулу ДНК, которая может быть применена для трансформации растения. Рекомбинантные

молекулы ДНК, как указано в перечне последовательностей, могут быть, например, вставлены в вектор как часть конструкции, имеющей рекомбинантную молекулу ДНК, функционально связанную с промотором, который функционирует в растении для управления экспрессией сконструированного белка, кодируемого рекомбинантной молекулой ДНК. Способы конструирования ДНК-конструкций и векторов хорошо известны в данной области техники. Компоненты ДНК-конструкции или вектора, содержащего ДНК-конструкцию, обычно включают, но не ограничиваются ими, одно или несколько из следующих: подходящий промотор для экспрессии функционально связанной ДНК, функционально связанную белок-кодирующую молекулу ДНК и 3'-нетранслируемый участок (3'-UTR). Промоторы, пригодные для осуществления настоящего изобретения, включают промоторы, которые функционируют в растении для экспрессии функционально связанного полинуклеотида. Такие промоторы разнообразны и хорошо известны в данной области и включают те, которые являются индуцибельными, вирусными, синтетическими, конститутивными, временно регулируемыми, пространственно-регулируемыми и/или пространственно-временно регулируемыми. Дополнительные необязательные компоненты включают, но не ограничиваются ими, один или несколько следующих элементов: 5'-UTR, энхансер, лидер, цис-действующий элемент, интрон, транзитные пептиды хлоропласта (ТПХ) и один или несколько маркерных трансгенов для селекции.

ДНК-конструкции согласно данному изобретению могут содержать молекулу ТПХ, функционально связанную с белок-кодирующими молекулами ДНК, предложенными в данном изобретении. ТПХ, пригодный для осуществления настоящего изобретения, включает тот, функционирование которого способствует локализации сконструированной белковой молекулы внутри клетки. Способствуя локализации белка внутри клетки, ТПХ может увеличить накопление сконструированного белка, защитить его от протеолитической деградациии, повысить уровень устойчивости к гербицидам и тем самым снизить степень повреждений после применения гербицидов. Молекулы ТПХ для применения в настоящем изобретении известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, *Arabidopsis thaliana* EPSPS ТХП (Klee et al., 1987), *Petunia hybrida* EPSPS ТПХ (della-Cioppa et al., 1986), сигнальную последовательность *cab-m7* кукурузы (Becker et al., 1992; PCT WO 97/41228) и сигнальную последовательность глутатионредуктазы гороха (Creissen et al., 1991; PCT WO 97/41228).

Рекомбинантные молекулы ДНК, согласно настоящему изобретению, могут быть синтезированы и модифицированы способами, известными в данной области техники, полностью или частично, особенно там, где желательно предоставить последовательности, пригодные для манипуляций с ДНК (такие как сайты узнавания рестриктаз или сайты клонирования на основе рекомбинации), предпочтительные по отношению к растению последовательности (использование кодонов растений или консенсусных последовательностей Козак) или последовательности, пригодные для конструирования ДНК-конструкции (такие как спейсерные или линкерные последовательности). Данное изобретение включает рекомбинантные молекулы ДНК и сконструированные белки, имеющие по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, около 85% идентичности последовательности, около 90% идентичности последовательности, около 91% идентичности последовательности, около 92% идентичности последовательности, около 93% идентичности последовательности, около 94% идентичности последовательности, около 95% идентичности последовательности, около 96% идентичности последовательности, около 97% идентичности последовательности, около 98% идентичности последовательности и около 99% идентичности последовательности с любой из рекомбинантных молекул ДНК или сконструированных белковых последовательностей, предложенных в настоящем документе, например с рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 и 53-59. Как применяется в настоящем документе, термин "процент идентичности последовательности" или "% идентичности последовательности" относится к проценту идентичных нуклеотидов или аминокислот в эталонной ("запрос") линейной полинуклеотидной или полипептидной последовательности (или ее комплементарной цепи) по сравнению с тестовой ("субъект") последовательностью (или ее комплементарной цепью), когда две последовательности оптимально выровнены (с соответствующими нуклеотидными или аминокислотными вставками, делециями или пробелами, составляющими менее 20% эталонной последовательности в окне сравнения). Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения хорошо известно специалистам в данной области техники и может быть выполнено с помощью таких инструментов, как алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана, алгоритм выравнивания гомологии Нидлмана и Вунша, способ поиска схожести Пирсона и Липмана, а также с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, которые доступны в составе пакета программного обеспечения Sequence Analysis GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., Сан-Диего, Калифорния), MEGAlign (DNASar, Inc., 1228 S.Park St., Мэдисон, Висконсин 53715), и MUSCLE (версия 3.6) (RC Edgar, Nucleic Acids Research (2004) 32(5): 1792-1797) со стандартными параметрами. "Доля идентичности" для выровненных сегментов тестовой последовательности и эталонной последовательности представляет собой количество идентичных компонентов, которые являются общими для двух выровненных последовательностей, деленное на общее количество компонентов в сегменте эталонной последовательности, т.е. всю эталонную последовательность или меньшую определенную

часть эталонной последовательности. Процент идентичности последовательности представлен как доля идентичности, умноженная на 100. Сравнение одной или более последовательностей может производиться с полноразмерной последовательностью или ее частью или более длинной последовательностью.

Сконструированные белки могут быть получены путем изменения (т.е. модификации) белка дикого типа, чтобы продуцировать новый белок с новой комбинацией полезных белковых характеристик, таких как измененные $V_{\max}$, K_m , субстратная специфичность, селективность по субстрату и стабильность белка. В белке, в определенных аминокислотных позициях, могут быть сделаны модификации, и может быть обнаружена аминокислотная замена на другую аминокислоту в этой позиции в природе (т.е. в белке дикого типа). Иллюстративные аминокислотные позиции относительно последовательности белка RdpA дикого типа (SEQ ID NO: 60), полезные для белковой инженерии, изображены на фиг. 3. На фиг. 6А, 6Б, 6В, 6Г, 6Д проиллюстрировано множественное выравнивание последовательности RdpA дикого типа и сконструированных белковых последовательностей SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52.

Сконструированный белок может быть сконструирован таким образом, чтобы иметь по меньшей мере около 92% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52, и содержать по меньшей мере одну из этих аминокислотных мутаций. Таким образом, сконструированные белки, предложенные в изобретении, предусматривают новый белок с одной или несколькими измененными белковыми характеристиками относительно белка дикого типа, обнаруженного в природе. В одном варианте реализации изобретения сконструированный белок имеет измененные белковые характеристики, такие как улучшенная или пониженная активность по отношению к одному или нескольким гербицидам, или улучшенная стабильность белка по сравнению с аналогичным белком дикого типа, или любую комбинацию таких характеристик. В одном варианте реализации изобретения в изобретении предложен сконструированный белок и рекомбинантная молекула ДНК, которая кодирует этот белок, имеющий по меньшей мере около 80% идентичность последовательности, около 85% идентичность последовательности, около 90% идентичность последовательности, около 91% идентичность последовательности, около 92% идентичность последовательности, около 93% идентичность последовательности, около 94% идентичность последовательности, около 95% идентичность последовательности, около 96% идентичность последовательности, около 97% идентичность последовательности, около 98% идентичность последовательности и около 99% идентичность последовательности с любой сконструированной последовательностью белка, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 и 46-52. Аминокислотные мутации могут быть произведены в виде одиночной замены аминокислоты в белке или в сочетании с одной или несколькими другими мутациями, такими как одна или несколько других аминокислотных замен, делеций или вставок. Мутации могут быть произведены, как описано здесь или любым другим способом, известным специалистам в данной области техники.

Трансгенные растения.

Аспект изобретения включает трансгенные растительные клетки, трансгенные растительные ткани, трансгенные растения и трансгенные семена, которые содержат рекомбинантные молекулы ДНК и сконструированные белки, предложенные в изобретении. Эти клетки, ткани, растения и семена, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК и сконструированные белки, демонстрируют гербицидную устойчивость к одному или нескольким гербицидам на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидам на основе феноксикислот и гербицидам на основе пиридинилоксикислот.

Подходящие способы трансформации клеток растения-хозяина для применения с настоящим изобретением включают практически любой способ, с помощью которого ДНК может быть введена в клетку (например, когда конструкция рекомбинантной ДНК стабильно интегрируется в растительную хромосому) и который хорошо известен в данной области техники. Иллюстративным и широко применяемым способом введения рекомбинантной ДНК-конструкции в растения является агробактериальная система трансформации, которая хорошо известна специалистам в данной области техники. Трансгенные растения могут быть регенерированы из трансформированной растительной клетки с помощью способов растительной клеточной культуры. Трансгенное растение, гомозиготное по трансгену (т.е. имеет две аллельные копии трансгена), может быть получено путем самоопыления (самооплодотворение) трансгенного растения, которое содержит единственный аллель трансгена, например, путем самоопыления растения R0, для получения R1 семян. Одна четверть полученных R1 семян будет гомозиготной по трансгену. Растения, выращенные из прорастающих R1 семян, могут быть проверены на зиготность, как правило, с применением анализа SNP, секвенирования ДНК или анализа термической амплификации, который позволяет различать гетерозиготы и гомозиготы и называется анализом зиготности.

Растения, семена, части растений, растительные ткани и клетки, предложенные в изобретении, проявляют гербицидную устойчивость к одному или нескольким гербицидам на основе АОФП, гербицидам на основе феноксикислотным и гербицидам на основе пиридинилоксильных кислот. Гербициды на основе АОФП воздействуют на ацетилкоэнзим А карбоксилазу растения (АККаза), которая является частью биосинтетического пути жирных кислот. Травяные растения чувствительны к этим гербицидам, потому что они содержат гербицид-чувствительную АККазу в их пластидах и цитозоле. Гербициды на основе

АОФП хорошо известны в данной области техники и коммерчески доступны. Примеры гербицидов на основе АОФП включают, но не ограничиваются ими, клодинафоп, цигалофоп, диклофоп, феноксапроп, феноксапроп-П, фентиапроп, флуазифоп, флуазифоп-П, галоксифоп, изоксапирифоп, метамифоп, пропаквизафоп, квизалофоп, квизалофоп-П и трифоп. Гербициды на основе феноксикислот и пиридинилюксоксикислот представляют собой синтетические ауксины, подобные растительному гормону индолуксусной кислоте (ГУК). Широколиственные растения чувствительны к этим гербицидам, которые вызывают быстрый, неконтролируемый рост, в конечном счете убивая растение. Примеры гербицидов на основе феноксикислот включают, но не ограничиваются ими, 2,4-D; 2,4-DB; кломепроп; дихлорпроп; денопроп; МХФУ; МХФБ и мекопроп. Примеры гербицидов на основе пиридинилюксоксикислот включают, но не ограничиваются ими, триклопир; флуороксибир; аминопиралид, клопиралид и пиклорам.

Гербициды можно наносить на участок произрастания растений, содержащий растения и семена, предложенные в изобретении, в качестве способа борьбы с сорняками. Растения и семена, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат признак устойчивости к гербицидам и как таковые являются устойчивыми к применению одного или нескольких гербицидов на основе АОФП, или гербицидов на основе феноксикислот, или гербицидов на основе пиридинилюксоксикислот. Может быть рекомендовано применение гербицида в коммерческой норме (1X), или в любой ее части, или в любой ее кратности, такой как в два раза больше, чем рекомендуемая коммерческая норма (2X). Нормы гербицидов могут быть выражены в виде кислотного эквивалента на фунт на акр (фунт к.э./акр) или фунта действующего вещества на акр (фунта д.в./акр). Применение гербицида включает по меньшей мере один гербицид, выбранный из группы, состоящей из гербицидов на основе АОФП и гербицидов на основе феноксикислот, и гербицидов на основе пиридинилюксоксикислот. Участок произрастания растений может содержать или не содержать сорняки во время применения гербицидов. Гербицидно-эффективная доза гербицидов на основе АОФП, применяемых в борьбе с сорняками, должна составлять от 0,01 до 16 фунтов д.в./акр в течение вегетационного периода. Например, 1X норма квизалофоп-П будет равна 0,08 фунта д.в./акр. Гербицидно-эффективная доза гербицидов на основе феноксикислот, применяемых в борьбе с сорняками, должна составлять от 0,01 до 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода. Например, норма 1X 2,4-D будет составлять примерно от 0,75 до 1,0 фунта к.э./акр. Гербицидно-эффективная доза гербицидов на основе пиридинилюксоксикислот, применяемых в борьбе с сорняками, должна составлять от 0,01 до 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода. Например, 1X норма флуороксибира должна составлять от 0,13 до 0,48 фунта к.э./акр.

Применение гербицидов может быть последовательным или гербицид может быть смешан в цистерне с одним, двумя или комбинацией нескольких гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот, гербицидов на основе пиридинилюксоксикислот или любым другим совместимым гербицидом. Многократное применение одного гербицида, или двух, или более гербицидов, в комбинации или отдельно, может быть использовано в течение вегетационного периода на участках, содержащих трансгенные растения согласно изобретению, для борьбы с широким спектром двудольных сорняков, однодольных сорняков или тех и других, например, два применения (таких как применение перед посадкой растений и применение после появления всходов или применение перед появлением всходов и применение после появления всходов), или три применения (такие как применения перед посадкой растений, применения перед появлением всходов и применение после появления всходов, или применение перед появлением всходов и два применения после появления всходов).

Как применяется в настоящем документе, "устойчивость" или "устойчивость к гербициду" означает способность растения, семени, растительной ткани, части растения или клетки противостоять токсическому воздействию одного или нескольких гербицидов. Устойчивость к гербициду растения, семян, растительной ткани, части растения или клетки можно измерить, сравнивая растение, семена, растительную ткань, часть растения или клетку с подходящим контролем. Например, устойчивость к гербицидам может быть измерена или оценена путем применения гербицида к растению, содержащему рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую белок, способный придавать устойчивость к гербициду (тестируемое растение), и к растению, не содержащему рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую белок, способный придавать устойчивость к гербициду (контрольное растение), а затем сравнить повреждение двух растений, при этом на устойчивость к гербициду тестируемого растения указывает уменьшение количества повреждений по сравнению с количеством повреждений контрольного растения. Гербицидо-устойчивое растение, семя, растительная ткань, часть растения или клетка проявляет уменьшенный ответ на токсические эффекты гербицида по сравнению с контрольным растением, семенем, растительной тканью, частью растения или клеткой. Как применяется в настоящем документе, термин "признак устойчивости к гербициду" представляет собой трансгенный признак, придающий растению улучшенную устойчивость к гербициду по сравнению с растением дикого типа или контрольным растением.

Трансгенные растения, потомство, семена, растительные клетки и части растений согласно данному изобретению могут также содержать один или более дополнительных трансгенных признаков. Дополнительные трансгенные признаки могут быть внесены путем скрещивания растения, содержащего трансген, содержащий рекомбинантную молекулу ДНК, предложенные в изобретении, с другим растением, содержащим дополнительный трансгенный признак (признаки). Как применяется в данном документе, термин

"скрещивание" означает размножение двух отдельных растений для получения потомства растений. Таким образом, два трансгенных растения могут быть скрещены для получения потомства, которое содержит трансгенные признаки. Как применяется в настоящем документе, термин "потомство" означает потомство любого поколения родительского растения, и трансгенное потомство содержит ДНК-конструкцию, предложенную в данном изобретении, унаследованную по меньшей мере от одного родительского растения. В альтернативном варианте дополнительный трансгенный признак(и) может быть введен путем совместной трансформации ДНК-конструкции для этого дополнительного трансгенного признака(ов) с конструкцией ДНК, содержащей рекомбинантные молекулы ДНК, предложенные в изобретении (например, со всеми ДНК-конструкциями, представленными как часть того же вектора, примененного для трансформации растений) или путем введения дополнительного признака(признаков) в трансгенное растение, содержащее ДНК-конструкцию, предложенную в изобретении, или наоборот (например, применяя любой из способов трансформации растений к трансгенному растению или растительной клетке). Такие дополнительные трансгенные признаки включают, но не ограничиваются ими, повышенную резистентность к насекомым, повышенную эффективность использования воды, повышенную урожайность, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян, улучшенные питательные качества, производство семян гибрида и устойчивость к гербицидам, при этом признак измеряется относительно растения дикого типа или контрольного растения. Такие дополнительные трансгенные признаки известны специалистам в данной области техники; например, перечень таких признаков предоставляется Службой инспекции здоровья животных и растений (APHIS) Министерства сельского хозяйства США (USDA), и они могут быть найдены на их веб-сайте по адресу: www.aphis.usda.gov.

Трансгенные растения и потомство, которые содержат трансгенный признак, предложенный в данном изобретении, могут быть использованы с любыми способами скрещивания, которые широко известны в данной области техники. В линиях растений, содержащих два или более трансгенных признака, трансгенные признаки могут быть независимо сегрегирующими, сцепленными или комбинацией обоих в линиях растений, содержащих три или более трансгенных признака. Рассматривается также обратное скрещивание с родительским растением и скрещивание с нетрансгенным растением, а также вегетативное размножение. Описания способов скрещивания, которые обычно применяются для различных признаков и культур, хорошо известны специалистам в данной области техники. Для подтверждения присутствия трансгена(ов) в конкретном растении или семени может быть выполнено множество анализов. Такие анализы включают, например, молекулярно-биологические анализы, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинги, ПЦР и секвенирование ДНК; биохимические анализы, такие как обнаружение присутствия белкового продукта, например, иммунологическими способами (ELISA и Вестерн-блоты) или с помощью ферментной функции; анализы части растения, такие как анализ листьев или корней; а также анализ фенотипа всего растения.

Интрогрессия трансгенного признака в генотип растения достигается в результате процесса конверсии обратного скрещивания. Растительный генотип, в который был интрогрессирован трансгенный признак, можно назвать преобразованным с помощью обратного скрещивания генотипом, линией, инбредом или гибридом. Подобным же образом генотип растения, лишенный желаемого трансгенного признака, может быть назван непреобразованным генотипом, линией, инбредом или гибридом.

Как применяется в настоящем документе, термин "содержащий" означает "включающий, но не ограничивающийся этим".

Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов реализации изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в следующих ниже примерах, представляют собой методы, обнаруженные изобретателями, которые хорошо функционируют при практической реализации изобретения, и поэтому могут рассматриваться как предпочтительные способы для его практической реализации. Однако в контексте данного изобретения, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах реализации изобретения могут быть сделаны многие изменения, однако при этом будет получен схожий или аналогичный результат, без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые вещества, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены описанными здесь веществами с тем же или сходным результатом. Все подобные аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Первоначальное конструирование белков и анализ ферментов.

Новые, сконструированные белки и рекомбинантные молекулы ДНК, кодирующие эти белки, были задуманы и созданы в лаборатории с применением технологий белковой инженерии. Сконструированные белки представляют собой ферменты, которые обладают оксигеназной активностью и сконструированы таким образом, чтобы они обладали измененными способностями к инактивации гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или обоих по отношению к белку дикого типа.

Были отобраны шестнадцать известных белков с оксигеназной активностью, и они были применены для создания консенсусного выравнивания последовательностей гомологов. Это было использовано в сочетании со структурно-ориентированными анализами для формирования рациональных стратегий разработки. Из этих анализов для мутагенеза были отобраны пять областей, каждая длиной от 13 до 21 аминокислоты, называемые в данном документе "островами". Мутации в каждом из этих регионов были созданы с применением методов, известных специалистам в данной области техники, таких как аланин-сканирующее мутирование; гомологически сканирующее мутирование; Pro/Gly сканирующее мутирование; обмен областями или мутирование; и комбинации этих различных методов (см., M. Lehmann and M. Wyss, *Current Opinion in Biotechnology* (2001) 12(4):371-375; B. Van den Burg and VGH Eijnsink, *Current Opinion in Biotechnology* (2002) 13(4):333-337; и Weiss et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97(16):8950-8954). Применяя эти способы, было получено более 1200 уникальных сконструированных белков и рекомбинантных молекул ДНК, которые их кодируют, для дальнейшего анализа и характеристики. Из-за большого количества сконструированных белков, полученных для тестирования, и необходимости тестирования и сравнения ферментативной активности каждого белка, были разработаны высокопроизводительные бактериальная экспрессия белка и система анализа ферментов для быстрого анализа с использованием неочищенных бактериальных экстрактов.

Экспрессия бактериального белка с высокой производительностью была достигнута путем синтеза рекомбинантной молекулы ДНК, кодирующей каждый сконструированный белок, и ее клонирования в бактериальный вектор экспрессии с С-концевой гистидиновой меткой (His-меткой), функционально связанной с рекомбинантной молекулой ДНК. Векторы применяли для трансформации *Escherichia coli* (*E. coli*) и индуцировали бактериальную экспрессию сконструированных белков. Ночные культуры *E. coli* выращивали в 96-луночных планшетах и культуры центрифугировали для осаждения бактерий. Бактериальный осадок лизировали добавлением 100 мкл лизирующей смеси (10 мл реагента для экстракции бактериальных белков (B-PER®) II (Pierce Biotechnology, Rockford, IL; 78260); 10 мкл лизоцима (10 мкг/мл конечная концентрация; Lysozyme American Bioanalytical, Натик, Массачусетс; каталожный номер AB011780-00005); и 40 мкл Benzonase® Nuclease (100 ед./мл конечная концентрация, Novagen, Дармштадт, Германия; каталожный номер 71206-3)) в каждую лунку. Планшеты встряхивали, затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C. 400 мкл буфера MOPS (pH 6,57) добавляли в каждую лунку и дебрис осаждали центрифугированием. Супернатант лизата осторожно удаляли и применяли в качестве неочищенного бактериального экстракта для последующего ферментативного анализа.

Высокопроизводительный анализ ферментативного разложения гербицида(ов) был разработан для анализа ферментативной активности сконструированных белков по отношению к различным гербицидам с применением неочищенного бактериального экстракта. Оксигеназную активность сконструированного белка (т.е. его ферментативную активность) измеряли с помощью колориметрического анализа конечной точки, применяя детектирование фенольных продуктов путем измерения оптического поглощения при 510 нм 4-аминоантипирина и феррицианида калия. Этот анализ был основан на анализе, описанном в Fukumori and Hausinger, *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268 (32):24311-24317. Ферментативные реакции анализировали в 96-луночных планшетах с общим объемом 150 мкл, которые содержали 20 mM MOPS pH 6,75, 50-200 мкМ NH₄FeSO₄, 50-200 мкМ аскорбата натрия, 1 mM α-кетоглутарата (αKG), 10 мкл клеточного лизата *E. coli*, содержащего экспрессированный сконструированный белок, и субстрат (либо гербицид на основе АОФП, или гербицид на основе феноксикислоты). После инициирования реакции с субстратом планшет инкубировали при различных температурах в течение различных периодов времени и "гасили" (останавливали) добавлением EDTA до конечной концентрации 6,25 mM или добавлением 15 мкл буфера с pH 10 (50 mM борной кислоты, 50 mM KCl) с последующим добавлением 15 мкл 0,2% 4-аминоантипирина и 15 мкл 0,8% феррицианида калия. Измерения абсорбции проводили на стандартном лабораторном спектрометре. Анализы масштабировали по мере необходимости для увеличения производительности.

Стандартные кривые были получены с применением очищенного белка или стандартов продукта.

Применяя эту высокопроизводительную систему бактериальной экспрессии белка и ферментативного анализа, была измерена активность приблизительно 1200 сконструированных белков относительно активности выбранного белка дикого типа, RdpA. В анализе с применением 96-луночных планшетов было 3 контроля (неочищенный бактериальный экстракт без сконструированного белка) и 3 положительных контроля (неочищенный бактериальный экстракт с белком дикого типа). Измеряли поглощение лунок и рассчитывали активность белка с применением следующей формулы:

$$\text{Активность}_i = \left(\frac{(\text{Абсорбция}_i - \text{Абсорбция}_{\text{WT}})}{(\text{Абсорбция}_{\text{дт}} - \text{Абсорбция}_{\text{нет}})} \right) \times 100$$

где Активность_i - активность образца, Абсорбция_i - поглощение образца, Абсорбция_{WT} - поглощение ячеек, содержащих экстракт из *E. coli*, экспрессирующих фермент дикого типа, и Абсорбция_{нет} представляет собой поглощение ячеек, содержащих экстракт из *E. coli* без сконструированного белка. Активность для каждого уникального сконструированного белка измерена в двух повторениях и приводится как среднее из двух измерений.

Основываясь на результатах высокопроизводительной системы ферментативного анализа, было отобрано около 545 уникальных сконструированных белков для дальнейшего анализа с применением очищенного сконструированного белка. В предварительном анализе сконструированного очищенного белка неочищенные бактериальные экспрессирующие лизаты готовили с применением QUIAGEN® Ni-NTA Agarose (Qiagen, Валенсия, Калифорния, каталожный номер 30230), следуя протоколу производителя.

Очищенные сконструированные белки анализировали с применением анализа ферментативной деградации гербицидов, описанного в этом примере 1, используя в качестве субстрата квизалофоп - гербицид на основе АОФП. Результаты анализа очищенных сконструированных белков в значительной степени подтвердили результаты высокопроизводительного ферментативного анализа. Результаты анализа для семи из около 545 сконструированных белков приведены в табл. 1, при этом ферментативная активность выражается как активность образца относительно активности фермента RdpA дикого типа (рассчитанная, как описано в данном примере 1). Данные этих анализов предоставили удивительный результат, заключающийся в том, что комбинации специфических мутаций проявляли себя значительно лучше, чем другие варианты, и показали, что ферментативная активность сконструированных белков может быть значительно изменена.

Таблица 1

Репликацион- ный номер	«Остров » 1-2-3	«Остров » 1-2-5	«Остров » 1-3-4	«Остров » 2-3-4	«Остров» 2-3-5	«Остро в» 2- 4-5	«Остро в» 3-4-5
1	-5,94	-4,14	-4,86	-2,84	138,99	48,12	4,06
2	-3,54	-2,64	-3,9	-0,05	117,67	48,84	5,56
3		-3,85			140,75		
4		-0,65			113,77		
5		-0,05			150,58		
6		2,14			141,27		

Применяя информацию, полученную из первых анализов, затем была выполнена белковая инженерия, как описано ранее, для получения дополнительных сконструированных белков, которые были протестированы, как описано в данном примере 1. Результаты высокопродуктивного ферментативного анализа с применением квизалофоп-П в качестве субстрата для пяти из этих дополнительно сконструированных белков приведены в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO	MON-HT	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Средняя активность квизалофоп-П
1	MON-HT51	117,02	124,87	110,17	117,35
4	MON-HT52	92,17	54,46	89,75	78,79
7	MON-HT53	105,34	105,31	106,13	105,60
9	MON-HT54	131,85	149,77	130,56	137,39
11	MON-HT55	118,48	99,79		109,13

Определение дополнительных белковых характеристик, таких как K_m , V_{max} и анализ структуры кристаллов, выполняли с применением пяти сконструированных белков из табл. 2. Для этого подробного анализа очищенный белок подготавливали следующим образом: 2 мл ночных культур *E. coli*, экспрессирующих трансген, который кодирует данный белок MON-HT, применяли для инокуляции 500 мл среды и выращивали при 37°C в течение 4 ч с последующим культивированием при 15°C в течение около 36 ч. Затем 250 мл из 500 мл бактериальной культуры осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 25 мл буфера для экстракции (20 мМ Трис, pH 7,8, 300 мМ NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол (БМЕ), 20 мМ имидазола (Fluka/Sigma- Aldrich, Сент-Луис, Миссури), 125 ед./мл бензоназы и 10 К ед./мл лизоцима (Novagen, Дармштадт, Германия). Суспензию клеток пропускали через дезинтегратор клеток один раз при 20000 psi, а затем этот клеточный лизат очищали центрифугированием при 35000×g в течение 20 мин при 4°C. Надосадочную жидкость, содержащую растворимые His-меченые белки, применяли для очистки белка. Для этой очистки супернатант вносили в 1 мл колонку HisTrap™ FF (Nickel Sepharose) (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси) с применением системы AKTexpress™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Буфер для промывки состоял из 20 мМ Tris pH 7,8, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола и 5 мМ БМЕ. Состав элюирующего буфера был

таким же, как и промывочного буфера, за исключением 500 мМ имидазола. Элюат из никелевой колонки обессоливали на тонкой колонке Quick Spin Protein Sephadex G-25 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), следуя протоколу производителя. Элюированный белок был в буфере, состоящем из 20 мМ Tris pH 7,8, 50 мМ NaCl и 5 мМ БМЕ. Чистоту экстракта белка оценивали с помощью анализа SDS-PAGE. Концентрацию белка определяли с помощью анализа Брэдфорда с применением красителя-реагента Bio-Rad Protein Assay (Biorad, Геркулес, Калифорния, каталожный номер 500-0006).

Очищенный белок для пяти сконструированных белков анализировали с применением ферментативного анализа, описанного в данном примере 1, но с четырьмя различными гербицидами на основе АОФП в качестве субстратов: квизалофоп-П, галоксифоп, феноксапроп и флуазифоп. Стандартные кривые получали с применением 2,4-дихлорфенола (2,4-DCP), который использовали для получения общей стандартной фенольной кривой. Количество фенола, производимого при анализе сконструированными белками, рассчитывали на основе этой стандартной кривой. Контрольные образцы представляли собой образцы с очищенным ферментом дикого типа, образцы без фермента и образцы без субстрата. Измерения ферментативной кинетики пяти сконструированных белков проводили с применением 0, 20, 40, 80, 160, 320, 640 или 1280 мкМ гербицидов квизалофоп-П, галоксифопа, феноксапропа или флуазифопа. В табл. 3 показаны K_m и V_{max} (выраженные как относительные величины), измеренные для пяти белков с четырьмя субстратами - гербицидами на основе АОФП. Белковые характеристики этих пяти сконструированных белков с каждым из четырех гербицидов на основе АОФП в качестве субстратов продемонстрировали, что ферментативная активность, а именно K_m и V_{max} , сконструированных белков может быть значительно изменена с помощью белковой инженерии.

Таблица 3

	квизалофоп-П		Галоксифоп		Феноксапроп		Флуазифоп	
	K_m (мкМ)	V_{max}	K_m (мкМ)	V_{max}	K_m (мкМ)	V_{max}	K_m (мкМ)	V_{max}
MON-HT51	570	120	250	48	870	180	4,0	12
MON-HT52	420	39	280	45	490	420	14	43
MON-HT53	690	95	290	64	1100	640	1,0	40
MON-HT54	560	32	380	40	2100	630	ND	ND
MON-HT55	250	320	450	190	200	450	50	320

Пример 2. Экспрессия сконструированных белков в кукурузе.

Были сконструированы векторы для трансформации растений, каждый из которых содержал рекомбинантную молекулу ДНК, кодирующую один из трех сконструированных белков, с белок-кодирующей последовательностью, оптимизированной для экспрессии в однодольных, MON-HT51 (SEQ ID NO: 3), MON-HT52 (SEQ ID NO: 6) и MON-HT55 (SEQ ID NO: 13). Векторы были созданы с применением различных комбинаций промотора, лидера, интрона и 3'-UTR, с и без ТПХ, функционально связанного с белок-кодирующей последовательностью. Также в векторы была включена вторая кассета ДНК, содержащая кодирующую последовательность *sr4-EPSPS*, которая должна применяться в трансгенных растениях для устойчивости к глифосату. Незрелые кукурузные (LH244) эмбрионы трансформировали этими векторами с применением *Agrobacterium tumefaciens* и стандартных способов, известных в данной области техники. Регенерированные R0 трансгенные проростки выращивали в теплице и опрыскивали примерно на стадии роста V2-V4 квизалофопом-П в объеме 0,04 или 0,08 фунта д.в./акр (Assure™ II, E.I. DuPont), представляющие 0,5X и 1X нормы соответственно. Образцы листьев применяли для идентификации трансгенных растений с единственной копией трансгенной ДНК-вставки (т.е. единичные трансформанты). Растения R0, которые содержали только одну копию и прошли тестирование опрыскиванием либо 0,5X, либо 1X квизалофоп-П, были самоопылены для получения семян R1. С помощью конструкций, содержащих MON-HT52, не были получены трансформанты. Был регенерирован только один единичный трансформант, после трансформации конструкцией, содержащей MON-HT51 с ТПХ, и конструкцией, содержащей MON-HT51 без ТПХ. Трансформирование проводили двумя парами векторов, которые содержали MON-HT55, причем каждая пара отличалась только тем, что содержала ТПХ или не содержала ТПХ.

Растения R1, экспрессирующие MON-HT55 с функционально связанным ТПХ и без него, выращивали в теплице, а гербицид квизалофоп-П применяли на стадии роста V2 в норме 0,08 фунта к.э./акр (1X). Растения оценивали на наличие повреждений через одиннадцать дней после обработки. Растения R1 сегрегировали по признаку в типичном соотношении по Менделю, и было замечено ожидаемое количество (~25%) нулевых сегрегантов (растений-потомков, не содержащих трансгенных признаков), которые не выжили после гербицидной обработки. Все трансгенные растения R1, экспрессирующие MON-HT55 с функционально связанным ТПХ, за исключением тех, которые представляли собой единичные трансформанты, показали только незначительное хлоротическое пятнышко на самых молодых открытых листьях после применения квизалофоп-П. Для этих растений после применения гербицида не было за-

регистрировано никаких повреждений, превышающих 5%. Также необработанные трансгенные растения не отличались фенотипически от необработанных контрольных растений. Фиг. 1А иллюстрирует контрольные растения LH244 и трансгенные растения, содержащие MON-HT55 (SEQ ID NO: 13) через 18 дней после нанесения квизалофоп-П.

Для оценки эффекта применения ТХП, которые использовали для направления сконструированного белка к хлоропласту растительных клеток, сравнивали трансгенные растения, содержащие трансгенную вставку с ТПХ и без ТПХ, функционально связанную с белок-кодирующей последовательностью. Растения, содержащие ТПХ, функционально связанные с белок-кодирующей последовательностью, продемонстрировали лучшую переносимость по отношению к квизалофоп-П по сравнению с растениями без ТПХ. При тестировании R1 в теплице, описанном в данном примере 2, большинство трансгенных растений, содержащих ТПХ, функционально связанных с белок-кодирующей последовательностью, продемонстрировали полную устойчивость к квизалофопу-П. Растения, не содержащие ТПХ, функционально связанные с белок-кодирующей последовательностью, продемонстрировали устойчивость к квизалофопу-П, но имели фенотипы с некоторыми умеренными повреждениями. Данные результаты продемонстрировали, что использование ТПХ, чтобы направить сконструированный белок к хлоропласту растительных клеток, усиливает устойчивость трансформированного растения к квизалофопу-П. Данный неожиданный результат был перепроверен в полевых испытаниях эффективности признака у растений R1, содержащих либо MON-HT51 с или без ТПХ, функционально связанных с белок-кодирующей последовательностью, либо MON-HT55 с или без ТПХ, функционально связанных с белок-кодирующей последовательностью. Данные растения R1 были единичными трансформантами, но все еще сегрегировали. В данном полевом испытании семена высевали в поле и обрабатывали следующим образом: 2X (0,16 фунта д.в./акр) квизалофоп-П перед посевом, 2X (0,14 фунта д.в./акр) галоксифоп на стадии роста V4, затем 2X квизалофоп-П на стадии роста V8. Более высокий процент растений, содержащих ТПХ, функционально связанных с белок-кодирующей последовательностью, выживал при обработках квизалофопом-П и галоксифопом, и такие растения имели более низкие оценки повреждений по сравнению с растениями, не содержащими ТПХ, функционально связанными с белок-кодирующей последовательностью. Данные приведены в табл. 4. Это подтвердило неожиданный вывод о том, что ТПХ, функционально связанные с белок-кодирующей последовательностью, обеспечивают более высокую устойчивость растений к применению гербицидов для сконструированных белков.

Таблица 4

Белок	ТПХ	Уникальные трансформанты	Средний % повреждение гербицидом
MON-HT51	Нет	1	95%
MON-HT51	Да	1	35%
MON-HT55	Нет	12	49%
MON-HT55	Да	3	25%
MON-HT55	Нет	2	90%
MON-HT55	Да	7	24%

Полевые испытания эффективности инбредных признаков проводились для оценки устойчивости к гербицидам на основе АОФП и чувствительности к гербицидам на основе циклогександионов (ЦГД) на инбредном фоне. Инбредные растения R2 получали путем самоопыления гомозиготного трансгенного растения R1 и сбора семян. Инбредные растения R2, содержащие MON-HT55 с или без ТПХ или MON-HT51 с ТПХ, оценивали в двух полевых локациях. Гербицидная обработка представляла собой обработку 2X квизалофопом-П в 0,16 фунта д.в./акр, примененного ППП (после посадки, но до прорастания), после чего применяли квизалофоп-П в 0,16 фунта д.в./акр на стадии роста V4, затем применяли квизалофоп-П в 0,16 фунта д.в./акр на стадии роста V8. Опытные участки оценивали по повреждению посевов через 7-10 дней после применения гербицидов по шкале 0-100, при этом нулевое значение обозначало отсутствие травм, а 100 обозначало полную гибель посевов. Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу дисперсии и среднего, разделенных при НДР (наименьшая достоверная разница) (0,05). Большинство инбредных растений R1 не имели повреждений, подтверждая то, что и MON-HT55 и MON-HT51, с или без ТПХ, обеспечивают устойчивость кукурузе к квизалофопу-П. Для проверки чувствительности к гербицидам на основе ЦГД, которые желательны для применения к самосевному контролю, растения обрабатывали 1X нормой клефодиума (0,25 фунта д.в./акр) на стадии роста V8. Самосевный контроль с применением нормы 1X клефодиума был на 100% эффективен для всех трансгенных растений, прошедших тестирование. Полевые испытания эффективности признаков гибридов проводились для оценки устойчивости к гербицидам на основе АОФП и чувствительности к гербицидам на основе циклогександионов

(ЦГД) на гибридном фоне. F1 гибридные растения получали путем скрещивания инбредного растения R1 с нетрансгенным растением и сбором семян. Полученные в результате растения F1, содержащие MON-HT55 (SEQ ID NO: 13) с или без ТПХ или MON-HT51 (SEQ ID NO: 3) без ТПХ, оценивали в шести полевых локациях. Полевые испытания эффективности гибридных признаков проводились в шести местах при различных условиях окружающей среды, включая условия высокой температуры и засухи во время полевого сезона. Это позволило оценить сконструированный белок в кукурузе в условиях высокой температуры и водного стресса. Данные представлены в табл. 5. Первоначальное повреждение от применения 2X квизалофоп-П было выше желаемого (>10% повреждений) через 7-10 дней после применения. Растения в конечном итоге смогли преодолеть повреждения путем дальнейшего роста, при этом, как правило, наблюдалось меньше травм от применения гербицида на стадии роста V8 по сравнению с применением на стадии роста V4. Также отмечалось чрезмерное повреждение, когда квизалофоп-П применялся очень рано (например, на стадии роста VE-V2).

Таблица 5

Белок	ТПХ	Оценено уникальных трансформантов	% травмы после V4 опрыскивания	% травмы после V8 опрыскивания
MON-HT51	Да	4	51,8	33,3
MON-HT55	Нет	9	46,8	78,8
MON-HT55	Да	17	42,6-48,3	14,2-38,8

Открытие того, что гибридные растения, экспрессирующие сконструированные белки MON-HT55 или MON-HT51, были чувствительными к применению квизалофоп-П при выращивании в полевых условиях при высокой температуре, было подтверждено с применением анализа на основе растений. Анализ на основе растений был разработан для проверки устойчивости гибридов F1 к квизалофопу-П в климатических камерах перед полевым тестированием. Анализ был разработан с применением гибридов F1, содержащих события трансформации кукурузы NK603 (патент США № 8273959) × MON89034 (патент США № 8581047) и гибридов F1, содержащих MON-HT55 × MON89034. Семена гибридов F1 проращивали в климатической камере в течение 1 недели и затем перемещали в одну из трех различных климатических камер для акклиматизации в течение двух дней при дневных/ночных температурах 20°C/20°C, 28°C/20°C и 38°C/30°C до применения 2X (0,16 фунта д.в./акр) квизалофоп-П. Как и ожидалось, растения, не содержащие MON-HT55 при всех режимах температур, были серьезно повреждены обработкой 2X квизалофопом-П (фиг. 1Б). Трансгенные растения, содержащие MON-HT55, показали хорошую устойчивость к обработке 2X квизалофопом-П при акклиматизации к дневным/ночным температурам 20°C/20°C или 28°C/20°C, но проявили значительную чувствительность при акклиматизации к дневным/ночным температурам 38°C/30°C (фиг. 1В). Это подтвердило, что анализ на основе растений может быть применен для скрининга белков в растениях в климатической камере по температурно-чувствительной активности.

Данные демонстрируют, что сконструированные белки могут быть экспрессированы в трансгенных растениях для сообщения устойчивости к гербицидам, и что необработанные трансгенные растения не отличаются фенотипически от необработанных контрольных растений. Эти данные также подтвердили, что экспрессия сконструированных белков в растениях позволила применять гербициды на основе ЦГД для самосевных контрольных растений. Неожиданно, данные показали, что применение ТПХ для направления к хлоропластам сконструированного белка усиливает признак устойчивости к гербицидам, и что устойчивость к гербицидам, обеспечиваемая сконструированными белками, является чувствительной к температуре, уменьшаясь в условиях высокой температуры.

Пример 3. Оптимизация сконструированных белков.

Открытие того, что гибридные растения, экспрессирующие сконструированные белки MON-HT55 или MON-HT51, были чувствительны к обработке квизалофопом-П при выращивании в полевых условиях при высокой температуре, было неожиданным и предоставило дополнительные белковые характеристики, которые можно было изменять в процессе конструирования белка. Была разработана новая серия ферментативных анализов *in vitro* и анализ ферментативной активности на основе растений для тестирования белков на чувствительность к высоким температурам.

Для создания сконструированных белков, оптимизированных для работы при более высоких температурах, анализ белковых мотивов, использованный в первых двух циклах конструирования белка, был объединен с данными кристаллической структуры для нескольких сконструированных белков. Это использовалось, чтобы инициировать дополнительные раунды мутагенеза, выполненные, как описано ранее, и таким образом было получено около 14 00 дополнительных сконструированных белков. Они были объединены с примерно 1200 сконструированными белками, описанными в примере 1, в общей сложности составив около 2600 сконструированных белков для скрининга с помощью нового теста чувствительности к температуре для идентификации белков, оптимизированных для работы при более высоких

температурах.

Чтобы проанализировать активность этих сконструированных белков при более высоких температурах, ферментативный анализ *in vitro* в примере 1 был модифицирован для того, чтобы точно определить условия предварительного нагревания всех компонентов анализа до желаемой температуры в течение 5 мин перед объединением компонентов и затем поддерживать реакцию при желаемой температуре во время прохождения реакции. Для нормирования результатов анализа в качестве субстрата для реакции применяли квизалофоп-П, и активность фермента была нормирована на основании 25°C считываний. Применяя эти параметры, рассчитывали температуру, при которой активность фермента составляла половину от максимальной ($T_{1/2}$). Было рассчитано, что $T_{1/2}$ для MON-HT55 составляет 29°C, а для RdpA дикого типа $T_{1/2}$ составляет 38°C (фиг. 2А).

Из-за большого количества вариантов тестирования применялся пятиступенчатый процесс скрининга. Табл. 6 показывает примерное количество вариантов, протестированных в различных скринингах.

Таблица 6

	Протестированные сконструированные белки
Первый скрининг	~2600
Второй скрининг	~1250
Третий скрининг	94
Четвертый скрининг	47
Пятый скрининг	11

Первый скрининг проводили с применением примерно 2600 сконструированных белков и применяли высокопродуктивную систему бактериальной экспрессии белка и анализа ферментов с неочищенными бактериальными лизатами, как описано в примере 1, но модифицировали для проведения при желаемых температурах 25 и 40°C с развитием окрашивания после гашения при 25°C. После данного скрининга было отобрано и допущено к следующему этапу около 1250 сконструированных белков. Второй скрининг был аналогичным, но включал белковое нормирование по образцам. После данного скрининга было отобрано и пропущено к следующему этапу 94 сконструированных белка. В третьем скрининге применяли очищенный белок с анализом ферментативной деградации гербицида, как описано в примере 1, но он был модифицирован для проведения при желаемых температурах 25°C и 40°C с развитием окраски после гашения, выполненной при 25°C. После данного скрининга было отобрано и пропущено к следующему этапу 47 сконструированных белков. Четвертый скрининг проводили с применением очищенного белка, нормировали концентрации белка, а скрининг включал квизалофоп-П и (для подмножества вариантов белков) 2,4-D в качестве субстратов с анализом конечной точки при 23 и 40°C.

После данного скрининга было отобрано и пропущено к следующему этапу 13 сконструированных белков.

Для пятого скрининга для каждого из одиннадцати сконструированных белков получали и очищали рекомбинантный белок для углубленного биохимического анализа. Данный биохимический анализ включал: (1) кинетический анализ (V_{max} и K_m), (2) анализ активности в диапазоне температур, (3) анализ плавления белка, (4) активность на дополнительных гербицидах на основе АОФП и (5) масс-спектрометрический анализ на пептидах для подтверждения идентичности. Биохимические анализы также проводили с очищенным рекомбинантным белком дикого типа и белком MON-HT55 для сравнения. Для кинетического анализа проводили анализ без конечных точек при 23°C с применением либо квизалофоп-П, либо 2,4-D в качестве субстрата. Рекомбинантные белки для данных анализов получали в бактериях и очищали с применением метки 6-His, прицепленной к С-концу белка. Результаты кинетического анализа с применением либо квизалофоп-П, либо 2,4-D в качестве субстрата представлены для десяти сконструированных белков, белка дикого типа и белка MON-HT55 в табл. 7 (стандартная ошибка показана в скобках). V_{max} выражается как удельная активность, мкМ, гербицидный продукт, мг, фермент-1, мин⁻¹; K_m , выраженная в мМ гербицидного субстрата. NDB указывает на то, что ферментативная активность может проявляться при более высоких концентрациях гербицида, но активность при тестируемых концентрациях была недостаточно сильной, чтобы обеспечить надлежащую кинетическую характеристику. Для MON-HT55 низкие уровни активности (V_{max}) с 2,4-D в качестве субстрата приводили к низкой достоверности предоставляемого значения. MON-HT7 имеет V_{max} с квизалофопом-П, которое на 40% больше, чем для фермента дикого типа, и V_{max} для 2,4-D, которое составляет лишь половину от такового фермента дикого типа. MON-HT1 имеет V_{max} для квизалофоп-П, которое составляет половину от такового фермента дикого типа, и V_{max} для 2,4-D, которое в 9,5 раз выше, чем таковое фермента дикого типа. Дифференциация белковой кинетики для MON-HT1 и MON-HT7 была неожиданной, поскольку между MON-HT1 и MON-HT7 было всего четыре аминокислотных различия. В частности, MON-HT1 имеет следующие аминокислоты в указанной позиции: I82; F105; T112 и V273, и MON-HT7 имеет следующие аминокислоты в указанной позиции: L82; V105; S112 и A273.

Таблица 7

Белок	V _{max} Квизалофоп	K _m Квизалофоп	V _{max} 2,4-D	K _m 2,4-D
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	0,44 (-0,04)	0,32 (-0,07)	0,03 (- 0,02)	0,69 (- 0,66)
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	0,76 (-0,04)	0,17 (-0,03)	0,95 (- 0,03)	0,03 (0,00)
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	1,41 (-0,11)	0,41 (-0,06)	0,23 (- 0,01)	0,04 (- 0,01)
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	0,77 (-0,04)	0,38 (-0,05)	0,10 (- 0,01)	0,27 (- 0,06)
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	0,30 (-0,02)	0,24 (-0,05)	NDB	NDB
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	0,57 (-0,03)	0,17 (-0,03)	NDB	NDB
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	0,39 (-0,03)	0,10 (-0,03)	NDB	NDB
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	1,94 (-0,12)	0,33 (-0,05)	0,04 (- 0,01)	0,06 (- 0,04)
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	0,46 (-0,02)	0,11 (-0,02)	0,11 (- 0,01)	0,14 (- 0,05)
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	0,53 (-0,02)	0,10 (-0,01)	NDB	NDB
MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	0,78 (-0,05)	0,13 (-0,03)	NDB	NDB
RdpA дикого типа	1,38 (-0,06)	0,27 (-0,03)	0,10 (- 0,01)	0,03 (- 0,01)

Была подробно проанализирована ферментативная активность в диапазоне температур для MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7 и MON-HT8. Данные анализы проводили, как описано выше. В качестве субстрата для данных реакций применяли квизалофоп-П или 2,4-D, и активность была нормирована на основе активности фермента дикого типа при 25°C. Полученные кривые активности представлены на фиг. 2Б (с квизалофопом-П в качестве субстрата), и на фиг. 2В (с 2,4-D в качестве субстрата). В случае применения квизалофоп-П в качестве субстрата, MON-HT55 оказался наиболее чувствительным к температуре, с $T_{1/2}$ 29°C. Фермент дикого типа имел $T_{1/2}$ 38°C. MON-HT1 и MON-HT8 были менее чувствительны к температуре, чем фермент дикого типа с $T_{1/2}$ 42 и 41°C соответственно, тогда как фермент дикого типа при этих температурах был на 90% неактивен. MON-HT2 и MON-HT7 были значительно менее чувствительны к температуре с $T_{1/2}$ 46 и 47°C соответственно, тогда как фермент дикого типа при этих температурах был полностью неактивен. Когда в качестве субстрата применяли 2,4-D, фермент дикого типа имел $T_{1/2}$ 36°C. MON-HT2, MON-HT7 и MON-HT8 были немного более чувствительны к температуре с более низким $T_{1/2}$, чем фермент дикого типа. MON-HT1 был немного менее чувствителен к температуре при $T_{1/2}$ примерно на 1°C выше, чем фермент дикого типа.

Был также проведен анализ плавления белка. Для определения плавления белка очищенный фермент добавляли в 96-луночные планшеты для микротитрования в стандартном буфере для хранения (30 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) с или без 50 мкМ Fe²⁺ и 1,0 mM aKG. Протеиновое разворачивание затем детектировали с помощью оранжевого красителя белкового геля SYPRO® (Invitrogen™ каталожный номер S6651, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) на приборе Real time-PCR BioRad CFX96™ (BioRad, Геркулес, Калифорния) со считываниями, выполненными от 10 до 95°C с шагом 0,5°C. $T_{1/2}$ (здесь температура, при которой разворачивалось 50% белка) показаны в табл. 8. Фермент дикого типа продемонстрировал стабилизацию с помощью 50 мкМ Fe²⁺ и 1,0 mM aKG. Напротив, 50 мкМ Fe²⁺ и 1,0 mM aKG мало влияли на стабильность любого из сконструированных белков. MON-HT55, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT6 и MON-HT10 имели температуры плавления в диапазоне от 41 до 48°C, которые были ниже температуры плавления фермента дикого типа. MON-HT1, MON-HT2, MON-HT5, MON-HT7, MON-HT8 и MON-HT9 имели температуры плавления между 58 и 67°C, которые от 8 до 17°C выше чем фермента дикого типа. Для MON-HT7 и MON-HT1 разница в точке плавления составляла 11°C в буфере

без Fe²⁺ и аКГ и 8°C в буфере с Fe²⁺ и аКГ. Это было неожиданно, поскольку между этими двумя ферментами было всего четыре аминокислотных различия. Эти данные по точке плавления ферментов подтверждают, что для сконструированных белков была оптимизирована белковая стабильность при более высоких температурах. Эти данные также соответствуют результатам анализа ферментативной активности белков, проводимого при разных температурах.

Таблица 8

Белок	Буфер	Буфер плюс Fe ²⁺ и аКГ
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	41°C	41°C
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	56°C	59°C
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	55°C	58°C
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	46°C	48°C
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	43°C	44°C
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	60°C	61°C
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	44°C	44°C
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	67°C	67°C
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	61°C	61°C
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	61°C	60°C
MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	44°C	44°C
RdpA дикого типа	42°C	50°C

Ферментативную активность вариантов белка MON-HT с галоксифопом, феноксапропом, флуазифопом и дихлорпропом в качестве субстратов определяли с применением анализа ферментативной активности, проводимого при 23°C с очищенным ферментом. Активность регистрировали как максимальную активность в процентах от активности фермента дикого типа, которая была установлена на уровне 100%. Данные представлены в табл. 9.

MON-HT55, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, и MON-HT9 имел максимальные активности для всех четырех субстратов, которые были меньше или равны максимальной активности фермента дикого типа с тем же самым субстратом. При использовании галоксифопа в качестве субстрата, MON-HT1, MON-HT2, MON-HT7 и MON-HT10 имели максимальную активность, которая была выше, чем активность фермента дикого типа. При применении фенакспропа в качестве субстрата, MON-HT1, MON-HT2, MON-HT6, MON-HT7, MON-HT8 и MON-HT10 имели максимальную активность, которая была выше, чем активность фермента дикого типа. При использовании флузифопа в качестве субстрата, MON-HT2 и MON-HT7 имели максимальную активность, которая была выше, чем активность фермента дикого типа. При применении дихлорпропа в качестве субстрата, MON-HT1, MON-HT7 и MON-HT8 имели максимальную активность, которая была выше, чем активность фермента дикого типа.

Таблица 9

Белок	Галоксифоп	Феноксапроп	Флюозифоп	Дихлорпроп
MON-HT55 (SEQ ID NO:11)	58	34	38	31
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	134	175	67	175
MON-HT2 (SEQ ID NO:18)	142	121	124	92
MON-HT3 (SEQ ID NO:22)	67	83	60	100
MON-HT4 (SEQ ID NO:25)	49	53	52	39
MON-HT5 (SEQ ID NO:28)	100	92	46	36
MON-HT6 (SEQ ID NO:31)	75	333	47	37
MON-HT7 (SEQ ID NO:34)	193	210	161	210
MON-HT8 (SEQ ID NO:37)	99	106	50	106
MON-HT9 (SEQ ID NO:40)	91	67	41	19
MON-HT10 (SEQ ID NO:43)	124	233	48	29
RdpA дикого типа	100	100	100	100

Ферментативная идентичность была подтверждена с помощью масс-спектропии. Для этого анализа очищенный белок разделяли на геле PAGE и окрашивали. Затем окрашенные полоски вырезали, сушили и расщепляли с помощью трипсина согласно стандартным протоколам. Расщепленные трипсином белковые препараты разделяли на Dionox UltiMat® 3000 RSLCnano LC System (Thermo Scientific, Саннивейл, Калифорния) с применением колонки Thermo Scientific™ AQUASIL™ C-18 Javelin™ Guard в стандартных условиях и впрыскивали для анализа MS-MS с применением масс-спектрометра Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, Саннивейл, Калифорния).

Чтобы оптимизировать белки для повышения активности в присутствии гербицидов на основе феноксикислот, было выполнено вычислительное белковое конструирование на кристаллической структуре для нескольких сконструированных белков. Это использовали для инициации дополнительных циклов мутагенеза, выполняемых, как описано ранее, но с применением бактериальной последовательности SEQ ID NO: 15, кодирующей белковую последовательность MON-HT1 (SEQ ID NO: 14), в качестве начальной последовательности. Было произведено около 472 дополнительных сконструированных белков. Они были объединены с примерно 2600 сконструированными белками, описанными в примере 1 и табл. 6, всего около 3072 сконструированных белков для идентификации белков, оптимизированных для работы в присутствии 2,4-D. Первый скрининг новых вариантов проводили с применением высокопроизводительной (ВПС) системы бактериальной экспрессии белка и анализа ферментов с неочищенными бактериальными лизатами, как описано в примере 1, но модифицировали для проведения при желаемых температурах 25 и 40°C с развитием окрашивания после гашения при 25°C. После этого высокопроизводительного скрининга было отобрано 34 сконструированных белка и допущено к следующему этапу скрининга с белковым нормированием по всем образцам. После данного скрининга 12 сконструированных белков были отобраны и допущены к следующему этапу скрининга с очищенным белком, проанализированные с применением анализа ферментативной деградации гербицидов, как описано в примере 1. Ферментативную термостабильность анализировали с помощью анализа ограниченного плавления белков. После данного скрининга было отобрано и допущено к следующему этапу растительного тестирования 7 сконструированных белков. Были отобраны три варианта ферментов для детальной характеристики с применением очищенного белка, при этом концентрации белка были нормированы, и скрининг включал субстраты квисаллофоп-П и 2,4-D, а также дополнительные гербициды, представленные в табл. 10 и 12, а также

характеристики плавление белков.

Кинетический анализ с применением анализа без конечных точек проводили при 23°C с применением либо квизалофопа-П, либо 2,4-D в качестве субстрата, как описано выше для очищенного белка фермента дикого типа, MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17. Данные демонстрируют значительное и неожиданное повышение ферментативной активности MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 по отношению как к ферменту RdpA дикого типа, так и к ферменту MON-HT1 при тестировании с применением 2,4-D в качестве субстрата. В частности, все три варианта показали примерно 2,5-3-кратное увеличение активности (V_{max}) относительно MON-HT1. Ферментативная активность вариантов MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 с квизалофопом в качестве субстрата была примерно аналогична активности MON-HT1. См. табл. 10.

Таблица 10

Белок	Квизалофоп		2,4-D	
	V_{max}	Km	V_{max}	Km
RdpA дикого типа	2,76 (0,11)	0,09 (0,013)	0,25 (0,01)	0,13 (0,017)
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	1,62 (0,05)	0,12 (0,012)	1,17 (0,01)	0,03 (0,002)
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	1,51 (0,05)	0,12 (0,013)	3,38 (0,05)	0,08 (0,004)
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	1,52 (0,06)	0,12 (0,017)	3,53 (0,04)	0,07 (0,004)
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	1,53 (0,05)	0,14 (0,014)	2,91 (0,04)	0,07 (0,004)

Анализ плавления белка проводили, как описано выше. Температуры плавления MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 были близки к температуре плавления MON-HT1 с $T_{1/2}$ в буфере в диапазоне 55-58°C, и с $T_{1/2}$ в буфере с Fe^{2+} и аКГ в диапазоне 60-62°C. Эти данные показывают, что варианты MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 имеют похожую ферментативную термостабильность по сравнению с MON-HT1. Эти данные по точке плавления ферментативных вариантов подтверждают, что для сконструированных белков была оптимизирована белковая стабильность при более высоких температурах. См. табл. 11.

Таблица 11

Белок	Температура плавления °C	
	Буфер	Буфер плюс Fe^{2+} и аКГ
RdpA дикого типа	43	53
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	58	62
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	57	62
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	55	60
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	57	61

Ферментативную активность вариантов белка MON-HT с триклопиром, флуороксирином, МХФУ, МСРВ, мекопропом в качестве субстратов определяли с применением анализа ферментативной активности, проводимого при 23°C, с очищенным ферментом. Активность регистрировали как максимальную активность в процентах от активности фермента дикого типа RdpA, которая была установлена на уровне 100%. Данные представлены в табл. 12. Для каждого из проанализированных белков (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17) с гербицидами триклопир и флуороксибир в качестве субстрата обнаруживалась активность, особенно в сконструированных вариантах, но активность не была достаточно сильной для количественной оценки. Для каждого из протестированных белков (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17) не было обнаружено активности с гербицидом МСРВ в качестве субстрата. Ферментативная активность с мекопропом в качестве субстрата была сниженной для каждого из вариантов MON-HT1, MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 по сравнению с ферментом дикого типа RdpA. Неожиданным результатом было то, что ферментативная активность с МХФУ в качестве субстрата была примерно в 6 раз выше для MON-HT1 и примерно в 10 раз выше для MON-HT13, MON-HT15 и MON-HT17 по сравнению с ферментом дикого типа RdpA. См. табл. 12.

Таблица 12

Белок	Мекопроп		МХФУ	
	Vmax	Km	Vmax	Km
RdpA дикого типа	100	100	100	100
MON-HT1 (SEQ ID NO:14)	63	142	600	21
MON-HT13 (SEQ ID NO:47)	37	92	1800	68
MON-HT15 (SEQ ID NO:49)	25	57	1300	59
MON-HT17 (SEQ ID NO:51)	27	65	1400	62

Пример 4. Экспрессия оптимизированных сконструированных белков в кукурузе.

Десять уникальных сконструированных белков, оптимизированных для работы при более высоких температурах, были отобраны для трансформации кукурузы и анализа в растениях. Были получены ДНК-конструкции для экспрессии этих сконструированных белков с применением кодонов, оптимизированных для экспрессии в злаках, с применением способов, известных специалистам в данной области техники. Энхансеры, промоторы, лидеры, интроны, ТПХ и 3'-UTR испытывались в различных комбинациях с сконструированными белками в данных ДНК-конструкциях. ДНК-конструкции применяли для трансформации незрелых эмбрионов кукурузы (LH244) с помощью данных векторов, используя *Agrobacterium tumefaciens* и стандартные способы, известные в данной области техники. Регенерированные R0 трансгенные проростки выращивали в теплице.

Трансгенные растения кукурузы R0 подвергали скринингу с обработкой квисалофопом-П (2X) плюс 2,4-D (2X) через 7-10 дней с последующей пересадкой в горшки (как правило, соответствует стадии роста V3-V4). На основе всех протестированных конструкторов были получены растения, содержащие единичную копию трансгенной вставки, которые прошли R0 скрининг. Растения R0 были самоопылены для того, чтобы произвести гомозиготные семена R1, и также использовали R0 в качестве особей мужского пола для скрещивания с инбредными растениями, содержащими трансгенную вставку кукурузы MON89034, для получения семян сегрегирующего гибрида F1, для проведения полевых испытаний эффективности.

Полевое исследование эффективности проводилось с сегрегирующими F1 гибридными растениями, с 50% гемизигот и 50% нулевых по трансгену растений. Устойчивость к квисалофопу-П (2X) плюс 2,4-D (2X) оценивалась с применением двух схем обработки гербицидами: (1) квисалофоп-П (Assure II) при 0,16 фунта д.в./акр (2X) плюс 0,25% об./об. неионного поверхностно-активного вещества (НИПАВ), наносимых на стадии роста VE-V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4, и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8, и 2) 2,4-D амин при 2 фунта к.э./акр (2X) плюс квисалофоп-П при 0,04 фунта д.в./акр (0,5X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимых на стадии роста VE-V2, с последующей обработкой 2,4-D амина при 2 фунта к.э./акр (2X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимых на стадии роста V4, после чего следует такая же обработка на стадии роста V8. 50% растений, которые были нулевыми по трансгену, были удалены после первой обработки квисалофопом-П на стадии роста VE-V2. Участки были визуальным образом оценены через 10-14 дней после обработки по уровню повреждений посевов в масштабе от 0 до 100, при этом 0 - отсутствие повреждений, а 100 являлось полным уничтожением посевов. Табл. 13 демонстрирует средний показатель повреждений на этапах роста V4 и V8 для обеих схем распыления. Оценка повреждений <10% рассматривалась как очень хорошая устойчивость, а оценка повреждений <20% рассматривалась как хорошая устойчивость. Процентная оценка повреждений с применением 2X 2,4-D на стадии роста V8 варьировала от 40% до минимума 0. Аналогичным образом, процентная оценка повреждений с применением 2X квисалофоп-П на стадии роста V8 колебалась от 90% до минимума 0. Различия в оценке повреждений между растениями, экспрессирующими один и тот же белок, вероятно, связаны с различиями в дизайне конструкции или местонахождении вставки трансгена. Эти данные подтвердили, что растения, экспрессирующие сконструированные белки, проявили устойчивость к обработке гербицидами 2,4-D и квисалофопом при 2X нормах.

Таблица 13

Белок	ТПХ	% процент повреждени й на стадии V4 Квизалофоп	% процент повреждений на стадии V8 Квизалофоп	% процент повреждений на стадии V4 2,4-D	% процент повреждений на стадии V8 2,4-D
MON-HT1	A	8,33	8,33	7,5	5,83
MON-HT1	Нет	7,14	7,86	12,86	10,71
MON-HT1	B	7,5	8,75	10	10
MON-HT1	C	0,45	0,91	14,09	11,36
MON-HT2	A	0	0	20	34,17
MON-HT2	Нет	0	0	20	33,75
MON-HT2	B	11,67	11,67	10,56	13,33
MON-HT2	C	14,33	14,33	12	12
MON-HT3	A	1,6	0,5	21,7	9,2
MON-HT4	A	6,1	0	22,3	12,3
MON-HT5	A	6,8	1,7	27,2	17,4
MON-HT6	A	8	1,7	27	12,7
MON-HT7	A	31,2	5	21,6	16,6
MON-HT8	A	1,25	1,25	10	10
MON-HT8	Нет	85	90	0	0
MON-HT8	B	9,17	8,33	12,5	11,67
MON-HT8	C	30	32,5	20	21,25
MON-HT9	A	5	5	20	40
MON-HT10	A	0	0	28	38,33
MON-	A+нет	6,67	5,56	20,56	18,89
HT3+MON-HT1					
MON-HT4+MON-HT8	A+нет	11,25	11,88	9,38	4,38

Был применен анализ ферментативной активности на основе растений для определения тепловой чувствительности, чтобы определить влияния повышенных ростовых температур на устойчивость к гербицидам трансгенных растений, содержащих оптимизированные сконструированные белки. Для проверки на устойчивость к квизалофопу-П при повышенных ростовых температурах (полученного путем скрещивания гомозиготного растения R1, экспрессирующего один из белков MON-HT, с инбредным трансгенным растением кукурузы MON89034), семена F1 гибрида кукурузы проращивали в климатической камере в течение 10 дней при дневной температуре 28°C и ночной температуре 20°C при 50% влажности. Через 10 дней растения переносили для акклиматизации в течение 3 дней при одном из трех разных дневных и ночных температурных режимов: (1) дневная и ночная температуры установлены на 20°C; (2) дневная температура 28°C и ночная температура 20°C или (3) дневная температура 38°C и ночная температура 30°C. По окончании акклиматизационного периода растения обычно находились на стадии роста V4 и опрыскивались 2X квизалофопом-П. Через 10 дней после обработки повреждения растений оценивались по шкале от 1 до 5, в которой 0 - не наблюдалось видимых повреждений, 1 - хлоротическая пятнистость, 2 - хлоротические полосы, 3 - разрывы листьев, 4 - растения с чахлым ростом и/или скрученными листьями, а 5 - мертвые растения или не наблюдалось роста. Результаты представлены на фиг. 4. F1 гибридные растения кукурузы, экспрессирующие MON-HT55, показали хорошую устойчивость (оценка повреждений около 2) к обработке распылением, когда дневная/ночная температуры составляли 20°C/20°C (фиг. 4А) или 28°C/20°C (фиг. 4Б) относительно гибридных контрольных растений F1 (трансформанты кукурузы NK603 X MON89034) (оценка повреждений - 5). Когда дневные/ночные температуры составляли 38°C/30°C, оценка повреждений гибридных контрольных растений F1 равнялась пяти, гибридные растения F1, экспрессирующие MON-HT55, имели средний коэффициент повреждений три, и гибридные растения F1, экспрессирующие MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4 или MON-HT7 имели оценку повреждений ≤1 (фиг. 4В). Сконструированные белки, оптимизированные для работы при более высоких температурах, обеспечивали устойчивость к гербицидам на основе АОФП,

когда растения, экспрессирующие данные сконструированные белки, подвергались воздействию высоких температур.

Для проверки на устойчивость к 2,4-D при повышенных ростовых температурах гибридные растения F1 получали путем скрещивания растения R1, содержащего MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT7 или MON-HT55 с инбредным растением, содержащим трансгенную вставку кукурузы MON89034. Гибридные растения F1 выращивали в теплице в течение одной недели при минимальной температуре 20°C и максимальной температуре 28°C при влажности от 50 до 80%. Через 1 неделю растения переносили для акклиматизации в течение трех дней при одном из двух разных дневных и ночных температурных режимов: (1) дневная и ночная температуры установлены на 20°C или (2) дневная температура 38°C и ночная температура 30°C. По окончании акклиматизационного периода растения обычно находились на стадии роста V4 и опрыскивались 4X 2,4-D амином. Через 10 дней после обработки повреждения растений оценивались с использованием шкалы повреждений от 0 до 100, при этом 0 - не было повреждений, а 100 - мертвое растение. Когда растения были акклиматизированы при дневных/ночных температурах 20°C/20°C до нанесения 4X 2,4-D амина, растения F1, содержащие MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT7 или MON-HT55, имели средние показатели повреждений <10%, а контрольные растения имели средние показатели повреждений менее 20% (фиг. 4Г). Когда растения были акклиматизированы при дневных/ночных температурах 38°C/30°C перед нанесением 4X 2,4-D амина, растения F1, содержащие MON-HT4 или MON-HT7, имели средние оценки повреждений <20%, растения F1, содержащие MON-HT1, MON-HT2 или MON-HT3, имели средние оценки повреждений менее 10% (фиг. 4Д), а контрольные растения и растения, включающие MON-HT55 F1 растения, имели средние оценки повреждений, равные 50% (фиг. 4Д). Эти результаты показали, что сконструированные белки, оптимизированные для работы при более высоких температурах, обеспечивали устойчивость к гербициду 2,4-D, когда растения, экспрессирующие эти сконструированные белки, подвергались воздействию высоких температур.

Отдельные полевые испытания эффективности признаков для квисалофоп-П и 2,4-D проводились в двух локациях, каждое с гибридными трансгенными растениями F1, полученными путем скрещивания инбредного растения, содержащего трансгенную вставку кукурузы MON89034, с растением R1, содержащим MON-HT55 (с ТПХ) MON-HT1 (с или без ТПХ), MON-HT2 (с или без ТПХ), MON-HT3 (с ТПХ), MON-HT4 (с ТПХ), MON-HT5 (с ТПХ), MON-HT6 (с ТПХ) или MON-HT7 (с ТПХ). Трансгенные гибридные растения F1, содержащие единичные трансгенные вставки кукурузы, NK603 x MON89034, применяли для сравнения, в качестве контроля.

В полевом испытании эффективности устойчивости к квисалофопу-П и чувствительности к клефодиму, применялась одна из четырех обработок гербицидом: (1) квисалофоп-П (Assure II) при 0,32 фунта д.в./акр (4X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадии роста VE-V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4, после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; (2) квисалофоп-П при 0,64 фунта д.в./акр (8X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадиях роста от VE до V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; (3) квисалофоп-П при 1,28 фунта д.в./акр (16X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадиях роста от VE до V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; или (4) клефодим при 0,25 фунта д.в./акр (1X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадии роста V8. Участки были визуальным образом оценены через 10-14 дней после обработки по уровню повреждений посевов в масштабе от 0 до 100, при этом 0 - отсутствие повреждений, а 100 являлось полным уничтожением посевов. В табл. 14 и 15 показаны средние оценки повреждений после применения гербицидов на стадии роста V4 или V8 соответственно.

Растения, содержащие MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 или MON-HT7 (все функционально связанные с ТПХ), показали очень хорошую устойчивость к квисалофопу-П с оценками повреждений менее 15% при всех нормах применения и как на стадии роста V4, так на стадии V8. Растения, содержащие MON-HT55, функционально связанный с ТПХ, показали от умеренной до плохой устойчивости с оценками повреждений от 0,8 до 78,8%. Оценки повреждений для контрольных растений после применения квисалофоп-П составили 99,5%. Эти результаты показывают, что растения, содержащие MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 или MON-HT7, функционально связанные с ТПХ, обладают очень хорошей устойчивостью к серийной обработке квисалофопом-П.

Растения, содержащие MON-HT1 или MON-HT2 с функционально связанным ТПХ, имели лучшую устойчивость к квисалофопу-П, чем растения, содержащие MON-HT1 или MON-HT2 без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-HT1 с функционально связанным ТПХ, имели оценки повреждений от 0 до 5,5% при всех обработках квисалофопом-П по сравнению с оценками повреждений от 3,3 до 18,8% растений, содержащих MON-HT1 без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-HT2 с функционально связанным ТПХ, имели оценки повреждений от 1,5 до 10% при всех обработках квисалофопом-П по сравнению с оценками повреждений от 16,3 до 82,5% растений, содержащих MON-HT2 без функционально связанного ТПХ. На фиг. 5 показаны растения, содержащие MON-HT2, функционально связанный с ТПХ (фиг. 5А), и растения, содержащие MON-HT2 без ТПХ (фиг. 5Б),

через 10-14 дней после применения квизалофоп-П (обработка 3) при 1,28 фунта д.в./акр (16X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на стадиях роста от VE до V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8. Контрольные растения не выживали, растения, содержащие MON-HT2 без ТПХ, обладали устойчивостью от умеренной до плохой, а растения, содержащие MON-HT2, функционально связанный с ТПХ, показали сильную устойчивость к обработке квизалофопом-П. Данные результаты подтвердили, что применение функционально связанного ТПХ значительно улучшает устойчивость к квизалофопу-П.

Все трансгенные растения имели оценки повреждений выше 90% при обработке 1X нормой клефодиа (0,25 фунта д.в./акр), применяемого на стадии роста V8, демонстрируя применение данного гербицида к самосевному контролю с трансгенными растениями, содержащими сконструированные белки.

В полевом испытании эффективности устойчивости к 2,4-D применялась одна из четырех обработок гербицидом: (1) 2,4-D-амин при 2 фунтах к.э./акр (2X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на стадиях от VE до V2, затем на V4 и затем на V8; (2) 2,4-D-амин при 4 фунтах к.э./акр (4X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на стадиях от VE до V2, затем на V4 и затем на V8; (3) 2,4-D-амин при 8 фунтах к.э./акр (8X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на стадиях от VE до V2, затем на V4 и затем на V8; (4) 2,4-D-амин при 16 фунтах к.э./акр (16X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на стадиях от VE до V2, затем на V4 и затем на V8. Участки были визуальным образом оценены, как указано выше. В табл. 14 и 15 показаны средние оценки повреждений после применения гербицидов на стадиях роста V4 или V8 соответственно.

Растения, содержащие MON-HT1, MON-HT2 или MON-HT6 (все функционально связанные с ТПХ), показали очень хорошую устойчивость к 2,4-D с оценками повреждений менее 10% и менее 17% при всех нормах обработки на стадиях роста V4 и V8 соответственно. Растения, содержащие MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5 или MON-HT7 (все функционально связанные с ТПХ), показали хорошую устойчивость к 2,4-D с оценками повреждений менее 20% и менее 22% при всех нормах обработки на стадиях роста V4 и V8 соответственно. Растения, содержащие MON-HT55, функционально связанный с ТПХ, показали от умеренной до плохой устойчивости с оценками повреждений от 7,5 до 66%. Оценки повреждений для контрольных растений после применения 2,4-D составляли от 40 до 82,2%. Данные результаты показывают, что растения, содержащие MON-HT1, MON-HT2, MON-HT3, MON-HT4, MON-HT5, MON-HT6 или MON-HT7, хорошо переносят серийную обработку 2,4-D.

Растения, содержащие MON-HT1 или MON-HT2 с функционально связанным ТПХ, в целом не показали заметных различий в устойчивости к 2,4-D по сравнению с растениями, содержащими MON-HT1 или MON-HT2, без функционально связанного ТПХ, как было видно из обработки квизалофопом-П. Растения, содержащие MON-HT1 с функционально связанным ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 16,3% при всех обработках 2,4-D по сравнению с оценками повреждений от 0 до 13,8% растений, содержащих MON-HT1, без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-HT2 с функционально связанным ТПХ, имели оценку повреждений от 1,3 до 15% при всех обработках 2,4-D по сравнению с оценками повреждений от 1,3 до 21,3% растений, содержащих MON-HT2, без функционально связанного ТПХ. Однако данная разница была заметна после обработки растений 2,4-D на стадии роста V4, содержащих MON-HT2 с функционально связанным ТПХ (4,5%-ная оценка повреждений при 8X, и 7,5% при 16X) по сравнению с растениями без ТПХ (13,75% оценка повреждений при 8X и 21,25% при 16X).

Таблица 14

Стадия роста V4	2x 2,4-D	4x 2,4-D	8x 2,4-D	16x 2,4-D	4x Квизало фоп	8x Квизало фоп	16x Квизало фоп
Контроль	52,5	64,4	73,8	74,7	99,5	99,5	99,5
MON-HT55	30,0	41,3	43,8	66,3	37,5	67,5	77,5
MON-HT55	20,0	23,1	50,0	55,0	12,5	43,8	62,5
MON-HT55	15,0	30,0	58,8	53,8	2,0	7,5	20,0
MON-HT55	12,5	30,0	48,8	52,5	8,0	18,8	48,8
MON-HT55	13,8	31,3	45,0	61,3	6,0	10,0	21,3

HT55							
MON- HT55	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	0,8	13,8	16,3
MON- HT55	7,5	22,5	53,8	63,8	5,5	12,5	13,8
MON- HT1 (нет ТПХ)	0,0	0,0	5,8	12,5	5,8	11,3	18,8
MON- HT1	0,0	0,0	5,0	6,3	0,0	0,8	4,5
MON- HT2 (нет ТПХ)	1,3	2,5	13,8	21,3	42,5	76,3	82,5
MON- HT2	1,3	0,0	4,5	7,5	1,5	0,8	10,0
MON- HT3	3,8	6,3	8,8	11,3	0,8	0,0	4,3
MON- HT4	0,0	1,3	8,8	18,8	2,8	3,3	13,8
MON- HT5	2,5	2,5	7,5	17,5	1,3	4,5	4,5
MON- HT6	0,0	2,0	5,8	8,8	0,0	1,3	2,8
MON- HT7	1,3	1,3	5,8	12,5	0,8	1,3	3,3

Таблица 15

Стадия роста V8	1х Клефоди ум	2х 2,4- D	4х 2,4- D	8х 2,4- D	16х 2,4- D	4х Квизало фоп	8х Квизало фоп	16х Квизало фоп
Контрол ь	93,6	40,0	52,8	64,1	82,2	99,5	99,5	99,5
MON- HT55	93,3	16,3	28,8	36,3	55,0	25,0	45,0	78,8
MON- HT55	93,3	14,4	20,0	39,4	56,9	10,0	31,3	41,3
MON-	93,3	11,3	16,3	30,0	47,5	3,8	3,8	16,3

HT55								
MON-HT55	93,3	11,3	20,0	35,0	47,5	3,8	20,0	38,8
MON-HT55	94,5	15,0	18,8	33,8	57,5	4,3	5,0	18,8
MON-HT55	93,3	нет дан-ных	нет дан-ных	нет дан-ных	нет дан-ных	2,5	6,3	18,8
MON-HT55	94,5	12,5	13,8	36,3	52,5	2,0	5,5	11,8
MON-HT1 (нет ТПХ)	94,5	2,5	4,0	8,8	13,8	3,3	7,5	16,3
MON-HT1	93,3	1,3	1,5	8,3	16,3	2,0	2,0	5,5
MON-HT2 (нет ТПХ)	92,0	5,0	8,8	13,8	25,0	16,3	52,5	77,5
MON-HT2	93,3	2,5	3,3	10,0	15,0	2,5	3,8	4,8
MON-HT3	94,5	5,5	5,5	11,3	13,8	2,5	2,0	6,0
MON-HT4	94,5	2,0	8,8	12,5	21,3	3,3	3,3	8,0
MON-HT5	92,0	3,3	4,0	10,0	21,3	2,5	0,0	8,0
MON-HT6	93,3	6,3	4,3	11,3	12,5	1,3	2,0	5,0
MON-HT7	93,3	2,0	2,8	9,3	20,0	1,5	0,8	5,5

Пример 5. Оценка влияния хлоропласт-нацеливающих пептидов на экспрессию оптимизированных сконструированных белков в кукурузе.

Для оценки различных хлоропласт-нацеливающих пептидов (ТПХ), были сконструированы векторы для трансформации растений, каждый из которых содержал рекомбинантную молекулу ДНК, оптимизированную для экспрессии в однодольных, и кодирующую MON-HT1 (SEQ ID NO: 16), MON-HT2 (SEQ ID NO: 20), MON-HT8 (SEQ ID NO: 39), MON-HT9 (SEQ ID NO: 42) или MON-HT10 (SEQ ID NO: 45). Векторы были созданы с применением той же комбинации промотора, лидера, интрона и 3'-UTR, но с одним из трех отдельных ТПХ (А, В или С) или без ТПХ, функционально связанного с белок-кодирующей последовательностью. См. табл. 16. ДНК-конструкции применяли для трансформации незрелых эмбрионов кукурузы (LH244) с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и стандартных способов, известных в данной области техники. Регенерированные R0 трансгенные проростки выращивали в теплице. Растения R0 самоопыляли, чтобы получить R1 гомозиготные семена. Растения R0 также использовали в качестве особей мужского пола для скрещивания с инбредными растениями, содержащими трансгенную вставку кукурузы MON89034, чтобы получить семена сегрегирующего гибрида F1 для проведения полевых испытаний эффективности.

Полевые испытания эффективности отдельных признаков для квазилифопа-П и 2,4-D проводились в двух локациях, каждое с гомозиготными инбредными трансгенными растениями (поколения R2 или R4). В этих полевых испытаниях применялась одна из двух обработок гербицидом: (1) квизалофоп-П (Assure II) при 0,16 фунта д.в./акр (2X) плюс 0,25% об./об. неионного поверхностно-активного вещества (НИПАВ), наносимых на стадии роста V4, после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; или (2) 2,4-D амин при 2 фунта к.э./акр (2X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимых на стадии роста V4, после чего следует такая же обработка на стадии роста V8. Оценки повреждений (процент повреждений посевов на стадии роста V4 (ПППВ4) или V8 (ПППВ8)) были проведены через 10-14 дней после обработок на стадиях V4 и V8. Ошибка была рассчитана с использованием НДР (0,05). Результаты показали, что данные растения имели устойчивость к 2X серийным обработкам либо квизалофопом-П, либо 2,4-D с оценкой повреждений ниже 10% после обработок на стадиях V4 и V8. См. табл. 16.

Таблица 16

Белок	ТПХ	2X квизалофоп-П		2X 2,4-D	
		ПППВ4 НДР (0,05)=1,45	ПППВ8 НДР (0,05)=2,2	ПППВ4 НДР (0,05)= 0,95	ПППВ8 НДР (0,05)= 1,6
MON-HT1	А	0	2,125	0	2,5
MON-HT1	В	0	1,75	0	1,25
MON-HT1	С	0	1,75	1,25	1,25
MON-HT1	нет ТПХ	0	1,25	0	1,25
MON-HT2	А	0	1,875	0,875	1,25
MON-HT2	В	0	0	0	2,5
MON-HT2	С	0	2	0	1,25
MON-HT2	нет ТПХ	1,25	3,5	0	2,5
MON-HT8	А	0	1,25	1,75	1,25
MON-HT8	В	0,75	2,5	0	1,25
MON-HT8	С	0	1,25	1,25	0
MON-HT9	А	0	0	3,75	1,25
MON-HT10	А	0	0	0	1,25

Образцы листьев собирали с растений, содержащих трансгенные кассеты, кодирующие MON-HT1, MON-HT2 и MON-HT8 с последовательностями ТПХ и без них, чтобы определить экспрессию мРНК, транскрибированную из трансгенной кассеты, кодирующей сконструированные белки. Анализ QuantiGene® проводили на экстрактах листьев для определения экспрессии мРНК трансгенной кассеты. Для этих анализов зонд был к общей последовательности 3'-UTR, присутствующей в каждой экспрессирующей кассете, используемой для получения трансгенных растений. Относительную экспрессию рассчитывали с помощью нормирования по генам домашнего хозяйства кукурузы. Образцы листьев собирали с каждого из восьми растений для каждой конфигурации конструкции, применяемой для получения трансгенных растений, а данные относительной экспрессии мРНК представляли собой среднее по восьми образцам со стандартной ошибкой.

Растения, содержащие трансгенную конструкцию, кодирующую либо MON-HT1 (SEQ ID NO: 14), либо MON-HT2 (SEQ ID NO: 18), имели более высокую относительную экспрессию трансгенной мРНК для конструкций, содержащих либо А, либо В ТПХ, чем для конструкций без ТПХ или с С ТПХ. Растения, содержащие трансгенную конструкцию, кодирующую MON-HT8 (SEQ ID NO: 37), имели аналогичную высокую относительную экспрессию трансгенной мРНК для конструкций, содержащих любой из трех ТПХ (А, В или С). См. табл. 17.

Таблица 17

MON-HT вариант	ТПХ	Относительный уровень экспрессии	Стандартная ошибка
MON-HT1	А	7,80	1,20
MON-HT1	В	5,95	1,63
MON-HT1	С	3,82	0,44
MON-HT1	нет ТПХ	4,31	0,68
MON-HT2	А	6,96	0,66
MON-HT2	В	6,16	0,65
MON-HT2	С	4,11	0,29
MON-HT2	нет ТПХ	4,66	0,45
MON-HT8	А	8,06	0,48
MON-HT8	В	7,62	0,46
MON-HT8	С	4,87	0,47
Контроль LH244	Нет	0,00	0,00

Отдельные полевые испытания эффективности признака для скрининга под давлением квисалофопа-П и 2,4-D проводились в одной локации с трансгенными гибридными растениями F1, полученными путем скрещивания инбредного растения, содержащего трансгенную вставку кукурузы MON89034, с растением R1, содержащим MON-HT1, MON-HT2, MON-HT8, MON-HT9 и MON-HT10 с и без функционально связанных последовательностей ТПХ. Трансгенные гибридные растения F1, содержащие единичные трансгенные вставки кукурузы, NK603 × MON89034, применяли для сравнения в качестве контроля.

В полевом испытании эффективности устойчивости к квисалофопу-П применялась одна из трех обработок гербицидом: (1) квисалофоп-П (Assure II) при 0,32 фунта д.в./акр (4X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадии роста VE-V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; (2) квисалофоп-П при 0,64 фунта д.в./акр (8X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадиях роста VE-V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8; (3) квисалофоп-П при 1,28 фунта д.в./акр (16X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, наносимые на стадии роста VE-V2, после чего следует такая же обработка на стадии роста V4 и после чего следует такая же обработка на стадии роста V8. Участки были визуальны оценены, как указано выше. В табл. 18 приведены средние оценки повреждений после применения гербицидов на стадиях роста V4 (ПППВ4) или V8 (ПППВ8) соответственно. Оценки повреждений для контрольных растений после применения квисалофопа-П составили 100%. Ошибка была рассчитана с использованием НДР (0,05).

Таблица 18

		4X квизалофоп-П		8X квизалофоп-П		16X квизалофоп-П	
MON-НТ вариант	ТПХ	ПППВ4 НДР (0,05)= 1,92	ПППВ8 НДР (0,05)= 2,3	ПППВ4 НДР (0,05)=4 ,7	ПППВ8 НДР (0,05)= 5,3	ПППВ4 НДР (0,05)= 5,0	ПППВ8 НДР (0,05)= 5,4
Нет	Нет	100	100	100	100	100	100
MON-НТ1	А	0	7,5	2,5	10	5	15
MON-НТ1	В	2,5	5	2,5	7,5	2,5	20
MON-НТ1	С	0	5	2,5	10	5	20
MON-НТ1	нет ТПХ	2,5	10	10	22,5	22,5	37,5
MON-НТ2	А	0	5	2,5	7,5	5	15
MON-НТ2	В	0	5	0	10	0	20
MON-НТ2	С	0	5	5	12,5	12,5	20
MON-НТ2	нет ТПХ	35	45	50	37,5	70	55
MON-НТ8	А	15	15	37,5	35	60	50
MON-НТ8	В	5	7,5	32,5	35	27,5	30
MON-НТ8	С	55	45	75	55	85	72,5
MON-НТ9	А	0	5	2,5	15	7,5	20
MON-НТ10	А	0	5	2,5	10	5	21

Растения, содержащие MON-НТ1 с любым из трех функционально связанных ТПХ (А, В или С), имели более высокую устойчивость к квизалофопу-П, чем растения, содержащие MON-НТ1 без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-НТ1 с функционально связанным А ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 15% при всех применениях квизалофопа-П. Растения, содержащие MON-НТ1 с функционально связанным В ТПХ, имели оценку повреждений от 2,5 до 20% при всех применениях квизалофопа-П. Растения, содержащие MON-НТ1 с функционально связанным С ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 20% при всех применениях квизалофопа-П по сравнению с растениями, содержащими MON-НТ1 без функционально связанного ТПХ, которые имели оценку повреждений от 2,5 до 37,5% при всех применениях квизалофопа-П.

Растения, содержащие MON-НТ2 с любым из трех функционально связанных ТПХ (А, В или С), имели более высокую устойчивость к квизалофопу-П, чем растения, содержащие MON-НТ2 без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-НТ2 с функционально связанным А ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 15% при всех применениях квизалофопа-П. Растения, содержащие MON-НТ2 с функционально связанным В ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 20% при всех применениях квизалофопа-П. Растения, содержащие MON-НТ2 с функционально связанным С ТПХ, имели оценку повреждений от 0 до 20% при всех применениях квизалофопа-П по сравнению с растениями, содержащими MON-НТ2 без функционально связанного ТПХ, которые имели оценку повреждений от 35 до 70% при всех применениях квизалофопа-П.

Растения, содержащие MON-НТ8 с функционально связанным А или В ТПХ, имели лучшую устойчивость к квизалофопу-П, чем растения, содержащие MON-НТ8 с функционально связанным С ТПХ. Растения, содержащие MON-НТ8 с функционально связанным А ТПХ, имели оценку повреждений от 15 до 60% при всех применениях квизалофопа-П. Растения, содержащие MON-НТ8 с функционально связанным В ТПХ, имели оценку повреждений от 5 до 35% при всех применениях квизалофопа-П по сравнению с растениями, содержащими MON-НТ8 с функционально связанным С ТПХ, которые имели оценку повреждений от 45 до 85% при всех применениях квизалофопа-П.

Растения, содержащие MON-НТ1 или MON-НТ2 с любым из трех функционально связанных ТПХ, и растения, содержащие MON-НТ9 или MON-НТ10 с функционально связанным А ТПХ, имели лучшую устойчивость к квизалофопу-П, чем растения, содержащие MON-НТ8 с любым из трех функционально связанных ТПХ. Растения, содержащие MON-НТ9 или MON-НТ10 с функционально связанным А ТПХ, имели устойчивость к квизалофопу-П во всех обработках, что было сопоставимо с растениями, содержащими MON-НТ1 или MON-НТ2 с любым из трех функционально связанных ТПХ. При самой высокой норме обработки (16X) квизалофопом, растения, содержащие MON-НТ1 или MON-НТ2 с функционально связанным А ТПХ, имели несколько более высокую устойчивость, чем растения, содержащие MON-НТ1 или MON-НТ2 с функционально связанным В или С ТПХ.

В полевом испытании эффективности признака на устойчивость к 2,4-D применяли три обработки гербицидом: (1) 2,4-D-амин при 4 фунтах к.э./акр (4X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на VE-V2, затем на V4 и затем на V8; (2) 2,4-D-амин при 8 фунтах к.э./акр (8X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на VE-V2, затем на V4 и затем на V8 кукурузы; (3) 2,4-D-амин при 16 фунтах к.э./акр (16X) плюс 0,25% об./об. НИПАВ, применяемых на VE-V2, затем на V4 и затем на V8. Участки были визуально оценены, как указано выше.

В табл. 19 приведены средние оценки повреждений кукурузы после применения гербицида 2,4-D на стадиях роста V4 (ПППВ4) или V8 (ПППВ8) соответственно. Оценка повреждений для контрольных растений после применений 2,4-D составляла от 80 до 96,25%. При самой высокой норме 2,4-D 16х), применяемой в течении V8, растения, содержащие MON-НТ1 или MON-НТ2, функционально связанный с любым из трех ТПХ (А, В или С), имели лучшую устойчивость по сравнению с растениями, содержащими MON-НТ1 или MON-НТ2, без функционально связанного ТПХ. Растения, содержащие MON-НТ1, MON-НТ2 или MON-НТ8 с или без функционально связанного ТПХ, имели лучшую устойчивость к 2,4-D во всех применениях, чем растения, содержащие или MON-НТ9 или MON-НТ10 без функционально связанного ТПХ А. В диапазоне применений 2,4-D относительный рейтинг устойчивости был следующим: растения, содержащие MON-НТ1, имеют лучшую устойчивость, чем растения, содержащие MON-НТ2, которые, в свою очередь, имели лучшую устойчивость, чем растения, содержащие MON-НТ8. В соответствии с данными испытания давления квисалофопа-П растения, содержащие MON-НТ1, MON-НТ2 или MON-НТ8, функционально связанные с А ТПХ, продемонстрировали небольшое математическое, но не статистически значимое преимущество над В и С транзитным пептидом. Ошибка была рассчитана с использованием НДР (0,05).

Таблица 19

		4X 2,4-D		8X 2,4-D		16X 2,4-D	
		ПППВ4 НДР (0,05) =3,4	ПППВ8 НДР (0,05)= 3,33	ПППВ4 НДР (0,05) =2,1	ПППВ8 НДР (0,05) =3,5	ПППВ4 НДР (0,05) =3,4	ПППВ8 НДР (0,05) =3,5
Нет - Контроль	Нет	80	88,75	82,5	95	87,5	96,25
MON- НТ1	А	5	5	5	10	7,5	15
MON- НТ1	В	5	5	5	10	10	15
MON- НТ1	С	5	5	5	10	10	17,5
MON- НТ1	нет ТПХ	5	5	7,5	10	10	22,5
MON- НТ2	А	5	5	10	7,5	10	20
MON- НТ2	В	5	5	5	10	10	25
MON- НТ2	С	10	15	10	10	15	20
MON- НТ2	нет ТПХ	7,5	7,5	17,5	42,5	25	45
MON- НТ8	А	7,5	5	10	12,5	15	30
MON- НТ8	В	5	7,5	10	27,5	10	20

MON- HT8	C	10	7,5	10	17,5	17,5	25
MON- HT9	A	17,5	55	25	75	45	90
MON- T10	A	32,5	70	55	87,5	45	90

Пример 6. Экспрессия оптимизированных сконструированных белков в сое.

Два сконструированных белка были отобраны для анализа в трансгенной сое. Были получены ДНК-конструкции для экспрессии MON-HT1 (SEQ ID NO: 14) и MON-HT2 (SEQ ID NO: 18) с применением кодонов, оптимизированных для экспрессии в двудольных, с применением способов, известных специалистам в данной области техники. Энхансеры, промоторы, лидеры, интроны, ТПХ и 3'-UTR в различных комбинациях были функционально связаны с сконструированными белками в данных ДНК-конструкциях. ДНК-конструкции применяли для трансформации сои с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и стандартных способов, известных в данной области техники. Регенерированные R0 трансгенные проростки выращивали в теплице. Примерно через 9 недель после трансформации на стадии 1-2 тройных листа были идентифицированы единичные R0-трансформанты, и их опрыскивали гербицидом 2,4-D в норме 0,5X (0,375 фунта к.э./акр), 2X (1,5 фунта к.э./акр) или 4X (3,0 фунта к.э./акр). Примерно через 2 недели после применения гербицидов растения были оценены по степени повреждения гербицидом по шкале от 1 до 3, где 1 = незначительное или полное отсутствие повреждений (<20%), 2 = умеренные повреждения (20-50%) и 3 = тяжелые повреждения (>50%).

Растения сои R0, содержащие каждую из конструкций, проявили устойчивость к 2,4-D с незначительными или отсутствующими повреждениями (<20% повреждений) или умеренными повреждениями (20-50%). Данные приведены в табл. 20. Это указывает на то, что сконструированные белки MON-HT1 и MON-HT2 могут давать устойчивость к 2,4-D в растениях сои.

Таблица 20

Белок	ТПХ	норма 2,4-D	Трансфор- манты с единичной копией трансгена	Трансфор- манты с повреж- дениями <20%	Трансфор- манты с повреж- дениями 20- 50%	Трансфор- манты с повреж- дениями >50%
MON-HT1	Нет	0,5X	130	120	10	0
MON-HT1	Нет	2X	36	6	30	0
MON-HT1	Да	2X	136	101	35	0
MON-HT2	Нет	0,5X	22	3	19	0
MON-HT1	Да	4X	11	5	6	0

Дополнительные пять сконструированных белков, оптимизированных для расщепления 2,4-D, затем были отобраны для анализа в трансгенной сое. Для экспрессии MON-HT13 (SEQ ID NO: 47), MON-HT14 (SEQ ID NO: 48), MON-HT15 (SEQ ID NO: 49), MON-HT17 (SEQ ID NO: 51) и MON-HT18 (SEQ ID NO: 52) создавали ДНК-конструкции с кодонами, оптимизированными для экспрессии в двудольных. Функционально связанные элементы экспрессии (промотор, лидер, интрон, ТПХ и 3'-UTR) были идентичны во всех конструкциях. Образцы листьев брали из ростков R0, и растения с единичной копией трансгена идентифицировали с применением ПЦР-анализа. Когда растения R0 с единичной копией трансгена имели примерно 2-3 тройных листа, их обрабатывали либо 1,5 фунта к.э./акр (2X), либо 3,0 фунта к.э./акр (4X) 2,4-D. Через семь дней после нанесения гербицида растения оценивали по повреждениям гербицидом в зависимости от процентной площади растения, показывающей повреждение, как указано выше.

При норме нанесения 2X растения сои, содержащие любой из шести вариантов MON-HT (MON-HT1, MON-HT13, MON-HT14, MON-HT15, MON-HT17 и MON-HT18), продемонстрировали отличную устойчивость к обработке 2,4-D, о чем свидетельствуют все, кроме двух, растения с единственной копией трансгена, имеющие оценку повреждений менее 20%; эти два трансформанта (одно с MON-HT13 и одно с MON-HT18) имели оценку повреждений 20-30%. При 4X норме из одиннадцати растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT1, у пяти растений оценка повреждений составила <20%, а у шести растений оценка повреждений составила 20-50%. Из одиннадцати растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT13, десять растений имели оценку повреждений <20% и одно растение имело оценку повреждений 20-50%. Из восьми растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT14, шесть растений имели оценку повреждений <20%, одно растение имело оценку повреждений 20-50% и одно растение имело оценку повреждений >50%. Из семи растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT15, пять растений имели оценку повреждений <20%, одно растение имело оценку повреждений 20-50% и одно растение имело оценку повреждений >50%. Из одина-

дцати растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT17, все одиннадцать имели оценку повреждений <20%. Из двенадцати растений с единственной копией трансгена, содержащих MON-HT18, девять растений имели оценку повреждений <20% и три растения имели оценку повреждений 20-50%. Эти результаты показывают, что растения сои, содержащие MON-HT1 (SEQ ID NO: 14), MON-HT13 (SEQ ID NO: 47), MON-HT14 (SEQ ID NO: 48), MON-HT15 (SEQ ID NO: 49), MON-HT17 (SEQ ID NO: 51) или MON-HT18 (SEQ ID NO: 52), обладают устойчивостью к 2,4-D при норме обработки 4X. Кроме того, это демонстрирует, что растения сои, содержащие MON-HT13 (SEQ ID NO: 47), MON-HT14 (SEQ ID NO: 48), MON-HT15 (SEQ ID NO: 49), MON-HT17 (SEQ ID NO: 51), или MON-HT18 (SEQ ID NO: 52), обладают улучшенной устойчивостью к 2,4-D при норме применения 4X по сравнению с MON-HT1 (SEQ ID NO: 14). Исходя из процента растений с единственной копией трансгена с оценкой повреждений менее 20%, растения сои, содержащие либо MON-HT13, либо MON-HT17, имеют лучшую устойчивость к 2,4-D, применяемого в 4X норме, по сравнению с растениями сои, содержащими MON-HT1, MON-HT14, MON-HT15 или MON-HT18. См. табл. 21.

Таблица 21

MON-HT	SEQ ID NO	норма 2,4-D	Трансформанты с единичной копией трансгена	Трансформанты с повреждениями <20%	Трансформанты с повреждениями 20-50%	Трансформанты с повреждениями >50%
MON-HT1	14	2X	12	12	--	--
MON-HT13	47	2X	13	12	1	--
MON-HT14	48	2X	9	9	--	--
MON-HT15	49	2X	5	5	--	--
MON-HT17	51	2X	12	12	--	--
MON-HT18	52	2X	12	11	1	--
MON-HT1	14	4X	11	5	6	--
MON-HT13	47	4X	11	10	1	--
MON-HT14	48	4X	8	6	1	1
MON-HT15	49	4X	7	5	1	1
MON-HT17	51	4X	11	11	--	--
MON-HT18	52	4X	12	9	3	--

Пример 7. Устойчивость к синтетическим ауксинам-гербицидам флуроксипиру, трайклопиру и МХФУ.

Определяли устойчивость кукурузы и растений сои, содержащих MON-HT1, к обработке 2,4-D, флуроксипиром, триклопиром и МХФУ. Семена F1 гибридов кукурузы трех уникальных трансформантов, содержащих MON-HT1 с А ТПХ, и семена сои R2 были посажены в горшки. Семена гибридной кукурузы, содержащие NK603 × MON89034, и ту же самую соевую зародышевую плазму, которая применялась для трансформации растений, использовали в качестве контроля. Растения выращивали в теплице, и для каждой обработки использовали четыре растения. Растения опрыскивали гербицидом в климатической камере, когда растения были высотой между 6-8 дюймами (соя) и 10-12 дюймами (кукуруза), затем переносили в теплицу, запрограммированную для поддержания оптимальных условий роста.

Для сои использовали норму применения гербицида 2X каждого из последующих компонентов: (1) 2,4-D амин 4 (1680 талонов к.э./гектар) (2) триклопир (840 талонов к.э./гектар, GARLON®); (3) флуроксипир (840 талонов к.э./гектар, Starane®); или (4) МХФУ (талонов к.э./гектар 1680). После применения триклопира, флуроксипира или МПКТ, основной симптоматикой на сое был тяжелый некроз и эпинастия. Оценки визуальных повреждений растений были сделаны для всех обработок по шкале оценки от 0 до 100%, где 0% представляли растения, эквивалентные необработанному контролю, и 100% представляли растения, которые были полностью мертвы. Все оценки были сделаны через семь дней после обработки. Все три трансформанта сои MON-HT1 показали хорошую устойчивость к 2,4-D амину (2,4-D) в среднем с менее чем 7% повреждений посевов по сравнению с контрольной группой с 90-97% повреждений посевов. Ни один трансформант сои не продемонстрировал устойчивости к триклопиру или флуроксипиру, при этом оценки повреждений во всех трех случаях в среднем составляли 81-97% посевов по сравнению с контрольной группой с 91% повреждений посевов. Один из трех трансформантов сои продемонстрировал низкий уровень устойчивости к МХФУ со средней оценкой повреждений 72%, тогда как два других трансформанта имели повреждения посевов, равные 90% по сравнению с контрольной группой с 90% повреждений. См. табл. 22.

Таблица 22

Обработка	Гербицид	2X норма (галлон к.э./ гектар)	Среднее повреждения % посевов сои для 4 образцов			
			MON-НТ1 Трансформант 1	MON-НТ1 Трансформант 2	MON-НТ1 Трансформант 3	Контроль
1	2,4-D амин	1680	4,5	6,5	5,3	90,0
2	триклопир	840	81,3	90,0	90,0	91,3
3	флуроксипир	840	96,3	93,8	97,5	91,3
4	МХФУ	1680	90,0	90,0	72,5	90,0
5	Контроли	0	0,0	0,0	0,0	0,0

Для кукурузы использовали норму применения гербицида 4X каждого из последующих компонентов: (1) 2,4-D амин 4 (3360 талонов к.э./гектар); (2) триклопир (1680 талонов к.э./гектар, GARLON®); (3) флуроксипир (1680 талонов к.э./гектар, Starane®); или (4) МХФУ (талонов к.э./гектар 3360). После обработки кукурузы триклопиром, флуроксипиром или МХФУ основной симптоматикой было полегание. Все три трансформанта кукурузы MON-НТ1 показали хорошую устойчивость к 2,4-D амину (2,4-D) в среднем с менее чем 15% повреждений посевов по сравнению с контрольной группой с 43% повреждений посевов. Три трансформанта кукурузы MON-НТ1, по-видимому, демонстрируют несколько низкую устойчивость к триклопиру с повреждениями посевов, в среднем равными 26-37% по сравнению с контрольной группой с 47% повреждений посевов. Три трансформанта кукурузы MON-НТ1, по-видимому, демонстрируют несколько низкую устойчивость к флуроксипиру с повреждениями посевов, в среднем равными 20-21% по сравнению с контрольной группой с 55% повреждений посевов. Два трансформанта кукурузы MON-НТ1 продемонстрировали хорошую устойчивость к МХФУ со средним повреждением посевов, равным менее чем 6% по сравнению с контрольной группой с 31% повреждением посевов. Третий трансформант кукурузы MON-НТ1 имел среднюю оценку повреждений равную 20%. См. табл. 23. Эти результаты низкой устойчивости к триклопиру и флуроксипиру и хорошей устойчивости к МХФУ согласуются с ферментативными данными in vitro с очищенным ферментом MON-НТ1.

Таблица 23

Обработки	Гербицид	4X норма (галлон к.э./ гектар)	Среднее повреждения % посевов кукурузы для 4 образцов			
			MON-НТ1 Трансформант 1	MON-НТ1 Трансформант 2	MON-НТ1 Трансформант 3	LN244
1	2,4-D амин	3360	5,8	15,0	5,3	43,8
2	триклопир	1680	26,3	37,5	35,0	47,5
3	флуроксипир	1680	20,0	20,0	21,3	55,0
4	МХФУ	3360	3,8	5,0	20,0	31,3
5	Контроли	0	0,0	0,0	0,0	0,0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 92% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52, где указанный полипептид обладает оксигеназной активностью в отношении по меньшей мере одного гербицида, выбранного из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридининоксикислот.

2. Рекомбинантная молекула ДНК по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидную последовательность выбирают из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 или 53-59.

3. Рекомбинантная молекула ДНК по п.1, отличающаяся тем, что рекомбинантная молекула ДНК функционально связана с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.

4. Рекомбинантная молекула ДНК по п.3, отличающаяся тем, что рекомбинантная молекула ДНК дополнительно функционально связана с молекулой ДНК, кодирующей транзитный пептид хлоропласта.

5. ДНК-конструкция, содержащая гетерологичный промотор, функциональный в растительной клетке, функционально связанный с рекомбинантной молекулой ДНК по п.1.

6. ДНК-конструкция по п.5, дополнительно содержащая молекулу ДНК, кодирующую транзитный пептид хлоропласта, функционально связанную с рекомбинантной молекулой ДНК.

7. ДНК-конструкция по п.5, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52.

8. ДНК-конструкция по п.5, отличающаяся тем, что ДНК-конструкция была введена в геном трансгенного растения.

9. Растение, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, обладающее устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

10. Семя, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, обладающее устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

11. Растительная ткань, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

12. Часть растения, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

13. Клетка растения, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

14. Растение, содержащее ДНК-конструкцию по п.5, где указанное растение обладает устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

15. Семя, содержащее ДНК-конструкцию по п.5, обладающее устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

16. Растительная ткань, содержащая ДНК-конструкцию по п.5, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

17. Часть растения, содержащая ДНК-конструкцию по п.5, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

18. Клетка растения, содержащая ДНК-конструкцию по п.5, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

19. Растение, содержащее полипептид, который кодируется рекомбинантной молекулой ДНК по п.1, обладающее устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

20. Семя, содержащее полипептид, который кодируется рекомбинантной молекулой ДНК по п.1, обладающее устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

21. Растительная ткань, содержащая полипептид, который кодируется рекомбинантной молекулой ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

22. Часть растения, содержащая полипептид, который кодируется рекомбинантной молекулой ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

23. Клетка растения, содержащая полипептид, который кодируется рекомбинантной молекулой ДНК по п.1, обладающая устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

24. Полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 92% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52, где указанный полипептид обладает оксигеназной активностью в отношении по меньшей мере одного гербицида, выбранного из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

25. Способ придания растению, семени, клетке или части растения устойчивости к гербициду, включающий введение молекулы ДНК по п.1 в растение, семя, клетку или часть растения, где указанная устойчивость к гербициду включает устойчивость по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из

гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что указанное растение, семя, клетка или часть растения содержит ДНК-конструкцию по п.5.

27. Способ по п.25, отличающийся тем, что молекула ДНК придает растению, семени, клетке или части растения устойчивость по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе арилоксифеноксипропионата (АОФП), гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

28. Способ получения устойчивого к гербицидам трансгенного растения, включающий стадию, в которой трансформируют растительную клетку или ткань рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

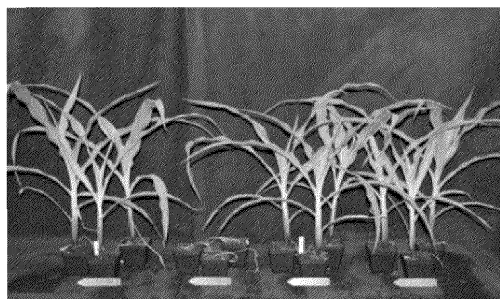
а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52;

б) нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 или 53-59; и

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 92% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52, и способный придать трансгенному растению устойчивость к гербициду;

и регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки или ткани, где указанное трансгенное растение обладает устойчивостью по меньшей мере к одному гербициду, выбранному из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот или гербицидов на основе пиридинилоксикислот.

29. Способ борьбы с сорняками на участке произрастания растений, включающий нанесение по меньшей мере одного гербицида, выбранного из гербицидов на основе АОФП, гербицидов на основе феноксикислот и гербицидов на основе пиридинилоксикислот, на указанный участок, содержащий растение или семя, обладающее рекомбинантной молекулой ДНК, нуклеотидная последовательность которой кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 92% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 или 46-52, причем растение или семя устойчиво по меньшей мере к одному указанному гербициду.

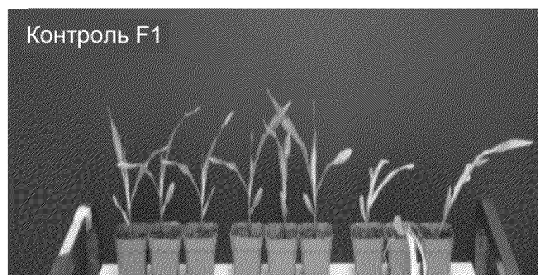


Необработанные Квизалофоп Необработанные Квизалофоп

LH244

SEQ ID NO:11

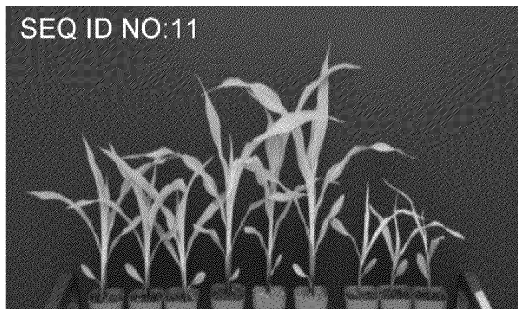
Фиг. 1А



20 °C/20 °C 28 °C/20 °C 38 °C/30 °C

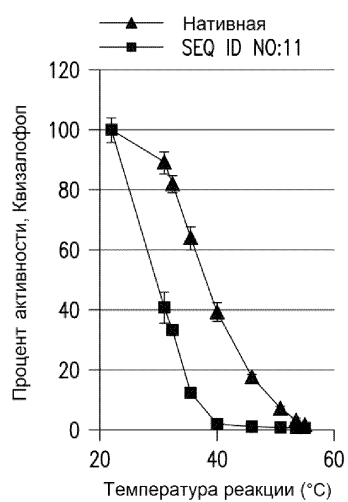
Фиг. 1Б

SEQ ID NO:11

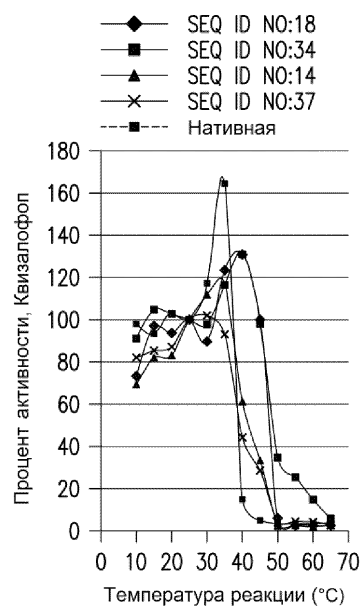


20°C/20°C 28°C/20°C 38°C/30°C

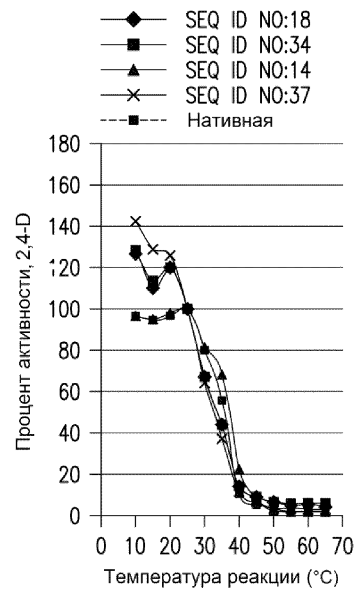
Фиг. 1В



Фиг. 2А



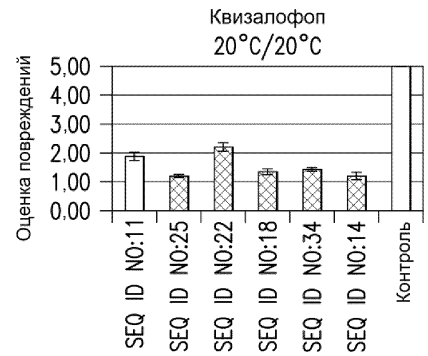
Фиг. 2Б



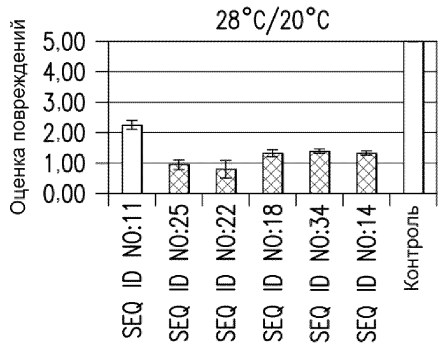
Фиг. 2В

MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEIL
DAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAFSRRFGPVDVPILKLSIEGYPEV
QMIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDT
GFISMYTAWETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAQNRFSN
TSVKVMDVDAGDRETVHPLVVTHPGSGRKGLYVNVQYQRIEGMTD
AESKPLLQFLYEHATRFDFTCRVRMKKDQVLVMDNLCTMHRAMPDY
AGKFRYLTRTTVGGVRPAR

Фиг. 3

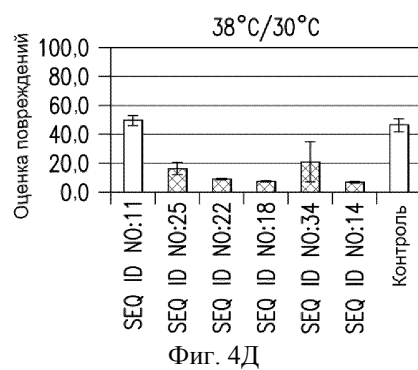
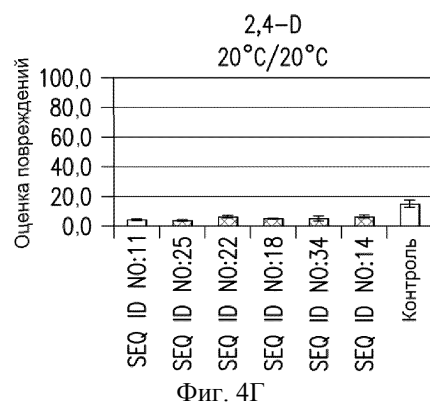
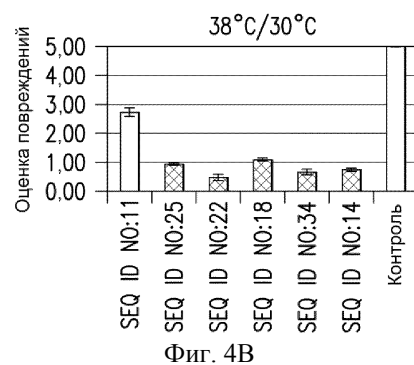


Фиг. 4А



Фиг. 4Б

035528



Квизалофоп



Контроль F1

MON-NT2
+ТПХ

Фиг. 5А

Квизалофоп



MON-HT2

Контроль F1

без ТПХ

Фиг. 5Б

SEQ ID NO:60	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:1	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:4	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:7	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:9	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:11	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:14	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:18	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:22	MHAALSPLSQRFERIAVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:25	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:28	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:31	MHAALSPLSQKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVTLREPLDDNTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:34	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:37	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:40	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPAQAITNEQHISF	70
SEQ ID NO:43	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLCGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:46	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:47	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:48	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:49	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:50	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:51	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70
SEQ ID NO:52	MHAALTPLTNKYRFIDVQPLTGVLGAEITGVDLREPLDDSTWNEILDAFHTYQVIYFPGQAITNEQHIAF	70

Консенсус

MHAAL·PL·.....I·VQPLtGVLGAEITGVdLREPLdTsTWNEILDAFHTYQVIYFPgQaITNEQhIdF 70

Фиг. 6А

SEQ ID NO:60	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGF	140
SEQ ID NO:1	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSSFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGF	140
SEQ ID NO:4	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGF	140
SEQ ID NO:7	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHSSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGF	140
SEQ ID NO:9	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHSSTFLDAPPAAVVMRAIDVPEHGGDTGF	140
SEQ ID NO:11	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGENWHTDSTFLDAPPAAVVMYAKEIPPYGGDTLF	140
SEQ ID NO:14	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRVIIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:18	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRVIIGDDWHSSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:22	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMYAKEVPPYGGDTLF	140
SEQ ID NO:25	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMYAREVPPYGGDTGF	140
SEQ ID NO:28	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:31	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMYAREVPPYGGDTGF	140
SEQ ID NO:34	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:37	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:40	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:43	SRRFGPVDVPVLLKSIIEGYPEVQMIIRREANESGRVIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:46	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:47	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:48	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:49	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:50	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:51	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140
SEQ ID NO:52	SRRFGPVDVPVILKSIIEGYPEVQMIIRREANESSRYIGDDWHTDSTFLDAPPAAVVMRAIEVPEYGGDTGF	140

Консенсус SRRFGPVPDPVP·LKSIEGYPEVQIMIRREANES·R·iGddWH·DStFLDAPPAAVVMrAieiPeyGGDTaF 140

Фиг 6Б

SEQ ID	N0:60	LSMYTAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPGS	210
SEQ ID	N0:1	LSMYTAYDALSDGLKKLIISGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPGS	210
SEQ ID	N0:4	LSMYTAYDALSDGLKKLIISGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPGS	210
SEQ ID	N0:7	LSMYTAYDALSDGLKKLIISGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPGS	210
SEQ ID	N0:9	LSMYTAYDALSDGLKKLIISGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPGS	210
SEQ ID	N0:11	TSMYTAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPET	210
SEQ ID	N0:14	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:18	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:22	ASMYTAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPET	210
SEQ ID	N0:25	LSMYTAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:28	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:31	LSMYSAWDTLSDTMKATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:34	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:37	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:40	LSMYSAWDTLSDTMKATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:43	LSMYSAWDTLSDTMKATIEGLNVVHSATRVFGSLYQAINRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:46	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:47	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:48	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:49	LSMYSAMETLSPAMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:50	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:51	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210
SEQ ID	N0:52	LSMYSAMETLSPTMQATIEGLNVVHSATKVFGLSYQATNRRFSNTSVKVMVDVAGDRETMHPLVVIHPVT	210

Консенсус: I S M Y · A w · t L S · t m · a t I e G L N V V H S A T · V F G S L Y Q A · N · R f S n T S V K V M D V d a G D R E T V H P L V t H P · t 210

Фиг. 6В

SEQ ID NO:60	GRKGLYNQVYQRIEGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:1	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHYAINDYHGQT	280
SEQ ID NO:4	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHYAINDYHGQT	280
SEQ ID NO:7	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHYAINDYHGQT	280
SEQ ID NO:9	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHYAINDYHGQT	280
SEQ ID NO:11	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKEGDVLWDNLCTQHAYAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:14	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:18	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:22	GRKGLYNQVYQRIEGMSEKESEPLLSFLFAHATKPEFTCRVRWKEGDVLWDNLCTQHAYAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:25	GRRALYNQVYQRIEGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:28	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:31	GRRALYNQVYQRIEGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:34	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRSVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:37	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRSVPDYAGF	280
SEQ ID NO:40	GRRALYNQVYQRIEGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:43	GRRALYNQVYQRIEGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:46	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATKFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:47	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:48	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:49	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:50	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:51	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280
SEQ ID NO:52	GRRALYNQVYQKIQGMTDAESKPLLQFLYEATQDFDFTCRVRWKKDQVLWDNLCTMHRAVPDYAGKF	280

Консенсус GR·LY·NQVYQ·I·GMtdaESk·LLqFLyeHAT·fdTCRVRWkKdQVLWDNLCTmH·avpDYagkf 280

Фиг. 6Г

SEQ ID NO:60	RYLTRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:1	RILHRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:4	RILHRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:7	RILHRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:9	RILHRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:11	RYLTRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:14	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:18	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:22	RYLTRTTVGGVVRPAR	295
SEQ ID NO:25	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:28	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:31	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:34	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:37	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:40	RYLTRTTVAGDRPAR	295
SEQ ID NO:43	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:46	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:47	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:48	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:49	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:50	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:51	RYLTRTTVAGDKPSR	295
SEQ ID NO:52	RYLTRTTVAGDKPSR	295

Консенсус RYLTRTTV·G·P·R 295

Фиг. 6Д



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2