

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035876**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.25

(21) Номер заявки
201690013

(22) Дата подачи заявки
2014.06.13

(51) Int. Cl. *C12C 12/00* (2006.01)
C12C 1/02 (2006.01)
A23L 1/10 (2006.01)
A23L 1/185 (2006.01)
A23L 1/202 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) **ЯЧМЕНЬ С ОЧЕНЬ НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ХОРДЕИНОВ**

(31) 2013902140; 2013902565

(32) 2013.06.13; 2013.07.11

(33) AU

(43) 2016.05.31

(86) PCT/AU2014/000619

(87) WO 2014/197943 2014.12.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**КОММОНВЕЛТ САЙНТИФИК
ЭНД ИНДАСТРИЭЛ РИСЕРЧ
ОРГАНИЗЭЙШН; ГРЕЙНЗ
РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТ
КОРПОРЕЙШН (AU)**

(72) Изобретатель:

**Таннер Грегори Джон, Хаунтт
Криспин Александр, Колгрейв
Мишель Лиза, Бланделл Малколм
Джеймс (AU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20120034339

Laitilan Wirvoitusjuomatehdas: 'Laitilan Kukko-oluet sopivat myos keliakiaakikoille' [retrieved from the internet on 04/09/2014]: URL: http://www.deski.fi/page.php?page_id=9&tiedote_id=1017 published on 22 January 2012 as per Wayback Machine, See whole of document

US-A1-20110135784

(57) Данное изобретение относится к способам получения пищевых продуктов или напитков на основе солода, которые пригодны для употребления субъектом с заболеванием целиакией. В частности, данное изобретение относится к способам получения пищевых продуктов или напитков на основе солода с очень низким содержанием хордеинов. В данном изобретении также представлены растения ячменя, которые производят зерно, что может применяться в способах по данному изобретению.

B1**035876****035876****B1**

Область применения изобретения

Данное изобретение относится к способам получения пищевых продуктов или напитков на основе солода, которые пригодны для употребления субъектом с заболеванием целиакией. В частности, данное изобретение относится к способам получения пищевых продуктов или напитков на основе солода с очень низким содержанием хордеинов. В данном изобретении также представлены растения ячменя, которые производят зерно, что может применяться в способах по данному изобретению.

Уровень техники

Заболевание целиакией (ЗЦ) представляет собой энтеропатию, опосредованную Т-клетками, стимулируемую употреблением проламинов зерновых, таких как пшеница, ячмень и рожь. Клинические симптомы ЗЦ включают утомляемость, диарею, вздутие живота, потерю массы тела, анемию и неврологические нарушения (Green et al., 2006). ЗЦ связано с повышенной частотой возникновения желудочно-кишечных злокачественных образований, таких как 10-кратное увеличение риска рака кишечника, от 3- до 6-кратного увеличения риска неходжкинской лимфомы и 28-кратное увеличения риска Т-клеточной лимфомы кишечника (Green et al., 2009), а также повышенной частотой возникновения анемии, остеопороза, неврологических расстройств и дополнительных аутоиммунных нарушений, таких как диабет (Skovbjerg et al., 2005). В случае наиболее изученных белков проламина, α -глиадина токсичность в значительной степени опосредована единственным глутамином в единственном пептиде (Anderson et al., 2000; Shan et al., 2002), который вызывает разрушительный каскад реакций, которые в конечном счете повреждают ворсинки тонкого кишечника, снижая поглощение питательных веществ и влияя на здоровье. В настоящее время подробно картированы токсические эпитопы целиакии для всех известных белков проламинов пшеницы, ячменя и ржи с использованием несмещенных популяций Т-клеток, выделенных из периферической крови HLA-DQ2⁺ больных целиакией после кратковременного приема в пищу пшеницы, ячменя и ржи (Tye-Din et al., 2010). Неожиданно оказалось, что только три высокоиммуногенные пептиды, происходящие из α -глиадина (ELQFPQPQLPYRPPQ, SEQ ID NO: 1), ω -глиадина/С-хордеина (EQFPQPQLPYRPPQ, SEQ ID NO: 2) и В-хордеина (EPEQPIEQPQPYRPPQ, SEQ ID NO: 3), могут обеспечивать 90% целиакиеспецифической реакции, вызванной полным набором белков пшеницы, ячменя и ржи.

Единственным современным методом лечения ЗЦ является продолжающееся всю жизнь исключение пищевого глютена, который состоит из семейства сходных белков, обнаруженных в пшенице (глиадины, глютелины), ржи (секалины), ячмене (хордеины) и овсе (авенины). Однако такие типы диет являются дорогостоящими (Lee et al., 2007) и связаны с низким потреблением пищевых волокон и высоким потреблением сахаров (Kupfer et al., 2005; Wild et al., 2010; Ohlund et al., 2010), которые сами по себе несут риски для здоровья. Исключение пищевого глютена приводит к нормализации медицинской статистики у большинства, но не у всех больных целиакией (Lanzini et al., 2009; Rubio-Tapia et al., 2010). Приблизительно 1% из большинства популяций по всему миру страдают от заболевания целиакией, однако остается до 50% взрослых с недиагностированным заболеванием или не проявляющих явных симптомов (Catassi et al., 1994; Fowell et al., 2006).

Основные семейства белков семян у зерновых культур *Triticaceae* представлены альбуминами, глобулинами и глютенотипными белками, собирательно названными проламинами (Shewry и Tatham, 1990). Альбумины и глобулины широко распространены среди цветковых растений, но проламины ограничено встречаются в травянистых растениях, в частности в подсемействе *Pooideae* (Hausch et al., 2002). Проламины так названы из-за того, что они содержат высокое соотношение аминокислот пролина и глутамина, препятствующих протеолизу во время пищеварения (Hausch et al., 2002). Ген α -глиадина был первым клонированным геном проламина, и в настоящее время многое известно о роли этого белка при заболевании целиакией (Kasarda et al., 1984). Токсичность этого проламина сосредоточена на единственном пептиде 57-QLQFPQPQLPYRPPQ-73 (SEQ ID NO: 4) с остатком глутамина Q65, являющимся ключевой аминокислотой. Мутация этого единственного глутамина на, к примеру, лизин ликвидирует целиакальную токсичность этого проламина (Anderson et al., 2000). Частично гидролизированные пептиды проходят через эпителий и достигают собственную пластинку слизистой оболочки благодаря неизвестному механизму; здесь Q65 дезамидируется с помощью тканевой трансглутаминазы (tTG) с образованием E65 (глутамат), увеличивая иммуностимулирующий потенциал пептида (Skovbjerg et al., 2004). Отрицательный заряд облегчает связывание пептида с рецепторами DQ2 (или реже DQ8) на поверхности антигенпрезентирующих клеток, обеспечивая презентацию пептидов особым глютеноспецифическим, ограниченным по DQ2, CD4⁺ Т-клеткам, которые нацелены на кишечник. Активированные таким образом CD4 Т-клетки подвергаются клональному размножению и, в свою очередь, содействуют размножению глютеноспецифических и TG2-специфических В-клеток с результирующей продукцией анти-TG2 и антиглютеиновых антител, характерных для заболевания целиакией. Клеточно-опосредованная Th1-реакция происходит посредством секреции воспалительных цитокинов (Tjon et al., 2010). Таким образом, простое белковое взаимодействие, облегченное введением единственного отрицательно заряженного остатка, инициирует серии специфических и направленных каскадов, в конечном счете приводящих к разрушению кишечных ворсинок.

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) представляет собой повсеместно культивируемую зерновую культуру, используемую для получения солода для пивоварения и пищевой промышленности. Осоложенный ячмень является основным ингредиентом в пиве, обеспечивая углеводный источник для ферментации. К сожалению, для больных целиакией ячменное пиво также содержит низкую, но целиакальную токсичную концентрацию хордеина (глютена) (Dostalek et al., 2006). Хордеины отвечают за половину белка ячменного зерна (Moravcova et al., 2009) и состоят из четырех мультигенных семейств: В-хордеины (30-45 кДа; 70% содержания хордеина) и С-хордеины (45-75 кДа; 20% содержания хордеина) преобладают в составе хордеина зерна, тогда как D- (105 кДа) и γ -хордеины (35-40 кДа) являются минорными компонентами (Shewry et al., 1999). Осоложенное сорго, пшено и гречиха используются как безглютеновые альтернативные варианты для получения пива (Wijngaard et al., 2007), однако для этих зерновых культур сложно получить воспроизводимое качество и низкую стоимость получения, как для ячменного пива.

Стандартное определение ВОЗ для безглютеновых пищевых продуктов, принятое Кодексом Алиментариус в 2008 г., требует чтобы "безглютеновым" маркировался пищевой продукт, приготовленный из зерновых культур, таких как пшеница и ячмень, который должен содержать менее 20 мг/кг (20 м.д.) глютена. Точный количественный метод для оценки содержания глютена в пищевых продуктах и напитках с использованием масс-спектрометрии представлен Colgrave et al. (2012).

В публикации WO 2009/021285 описано получение зерна ячменя, в котором было уменьшено содержание хордеина до менее 10% от содержания в зерне дикого типа, особенно по хордеинам В и С. Однако остается потребность в зерне с намного меньшими концентрациями хордеинов для получения пищевых продуктов и напитков, которые могут быть употреблены людьми с ЗЦ.

Следовательно, существует потребность в ячмене со значительно более низким содержанием индуцирующих ЗЦ хордеинов, который мог бы использоваться в пищевых продуктах и напитках для чувствительных к ЗЦ субъектов.

Сущность изобретения

Данные изобретатели получили зерно ячменя с очень низким содержанием хордеинов. Это зерно может использоваться для получения большого разнообразия пищевых продуктов и напитков на основе солода, которые могут быть употреблены субъектами, которые страдают от заболевания целиакией.

В первом аспекте в данном изобретении представлен способ получения пищевого ингредиента, или ингредиента напитка на основе солода, или пищевого продукта, или напитка на основе солода, причем способ включает (i) переработку ячменного зерна для получения солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы и/или (ii) смешивание ячменного зерна или солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы, полученных из указанного зерна, по меньшей мере с одним другим пищевым ингредиентом или ингредиентом напитка, причем ячменное зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 50 м.д. или менее хордеинов, тем самым получая пищевой ингредиент или ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или напиток на основе солода.

В другом аспекте в данном изобретении представлен способ получения пищевого ингредиента или ингредиента напитка на основе солода, пищевого продукта или напитка на основе солода, причем способ включает (i) переработку ячменного зерна, содержащего около 50 м.д. или менее хордеинов, для получения солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы и/или (ii) смешивание зерна ячменя или солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы, полученного из указанного зерна, по меньшей мере с одним другим пищевым ингредиентом или ингредиентом напитка, причем ячменное зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 50 м.д. или менее хордеинов, тем самым получая пищевой ингредиент или ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или напиток на основе солода.

В варианте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 20 м.д. или менее, около 10 м.д. или менее, около 5 м.д. или менее, от около 0,05 м.д. до около 50 м.д. или от около 0,05 м.д. до около 20 м.д., от около 0,05 м.д. до около 10 м.д., от около 0,05 м.д. до около 5 м.д., от около 0,1 м.д. до около 5 м.д., около 3,9 м.д. или около 1,5 м.д. хордеинов.

В другом варианте реализации изобретения средняя масса зерновки составляет по меньшей мере около 35 мг, по меньшей мере около 39 мг, по меньшей мере около 41 мг, по меньшей мере около 47 мг, от около 35 до около 60 мг, от около 40 до около 60 мг, от около 45 до около 60 мг, около 39,1, около 41,8 или около 47,2 мг.

В дополнительном варианте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат 20 м.д. или менее хордеинов, а средняя масса зерновки составляет от около 40 до около 60 мг. В другом варианте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат 20 м.д. или менее хордеинов, а средняя масса зерновки составляет от около 45 до около 60 мг. Специальное упоминание этих комбинаций не исключает другие комбинации этих признаков.

В дополнительном варианте реализации изобретения по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, от около 80 до около 98% или от около 80 до около 93% зерна не проходит через сито с размером ячеек 2,8 мм.

В дополнительном варианте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат 20 м.д. или менее хордеинов, средняя масса зерновки составляет от около 40 до около 60 мг, и по меньшей мере около 80% зерна не проходит через сито с размером ячеек 2,8 мм. В другом вари-

анте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат 20 м.д. или менее хордеинов, средняя масса зерновки составляет от около 45 до около 60 мг и по меньшей мере около 80% зерна не проходит через сито с размером ячеек 2,8 мм. Специальное упоминание этих комбинаций не исключает другие комбинации этих признаков.

В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения зерно получено из растения, которое обладает уборочным индексом по меньшей мере 40%, от около 40 до около 60%, от около 40 до около 55% или от около 40 до около 50%. В предпочтительном варианте реализации изобретения зерно получено из растения, которое обладает уборочным индексом от около 40 до около 50%.

В другом варианте реализации изобретения зерно обладает соотношением длины к толщине менее чем около 5, менее чем около 4, менее чем около 3,8, от около 2 до около 5 или от около 2,5 до около 3,8.

В дополнительном варианте реализации изобретения мука или цельнозерновая крупа, полученная из зерна, содержит около 10 м.д. или менее, около 5 м.д. или менее, от около 0,05 до около 10 м.д. или от около 0,05 до около 5 м.д., около 3,9 м.д. или около 1,5 м.д. хордеинов.

В варианте реализации изобретения солод или сусло, полученное из зерна, содержит менее чем около 50 м.д. или менее чем около 20 м.д. хордеинов.

В дополнительном варианте реализации изобретения зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, содержат концентрацию менее 10%, менее 5% или менее 2% от концентрации дикого типа, или в них отсутствует один или более одного, или все из

- i) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 53;
- ii) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 54;
- iii) С-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 55;
- iv) D-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 56,

причем каждая из концентраций составляет менее 10, менее 5 или менее 2% относительно концентрации в ячменном зерне дикого типа или солоде, сусле, муке или цельнозерновой крупе, полученным из указанного зерна, относящегося к разновидностям ячменя Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh или Commander.

В варианте реализации изобретения В-хордеины представлены по меньшей мере В1-хордеином (к примеру, содержащим аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 78) и В3-хордеином (к примеру, содержащим аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 79). В дополнительном примере С-хордеины содержат аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 80. В еще одном другом примере D-хордеины содержат аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 76.

В варианте реализации изобретения зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, дополнительно содержат концентрацию менее 10, менее 5 или менее 2% от концентрации дикого типа или в них дополнительно отсутствуют

- i) γ -хордеины, содержащие последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 57, и/или
- ii) авениноподобные А-белки, содержащие последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 52,

причем каждая из концентраций составляет менее 10, менее 5 или менее 2% относительно концентрации в ячменном зерне дикого типа или солоде, сусле, муке или цельнозерновой крупе, полученным из указанного зерна, относящегося к разновидностям ячменя Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh или Commander. В одном примере γ -хордеины содержат аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 81. В еще одном другом примере авениноподобные А-белки содержат аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 84.

Предпочтительно в вышеприведенном варианте реализации изобретения γ -хордеины, γ 1-хордеины и γ 2-хордеины.

В варианте реализации изобретения зерно является гомозиготным по аллели локуса Hor2, в которой большинство или все кодирующие В-хордеины гены удалены, или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, содержат ДНК, которая включает аллель локуса Hor2, в которой большинство или все кодирующие В-хордеины гены удалены.

В другом варианте реализации изобретения зерно является гомозиготным по нулевой аллели гена, кодирующего D-хордеин в локусе Hor3, или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, содержат ДНК, которая включает нулевую аллель гена, кодирующего D-хордеин, при этом нулевая аллель предпочтительно содержит стоп-кодон, мутацию сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки, инсерцию, делецию или кодирует усеченный D-хордеин, или в ней большинство или все кодирующие D-хордеины гены удалены.

В дополнительном варианте реализации изобретения усеченный D-хордеин имеет стоп-кодон в триплете, кодирующем аминокислоту номер 150.

В другом варианте реализации изобретения зерно является гомозиготным по аллели в локусе Lys3 ячменя, что приводит к отсутствию в зерне С-хордеинов, или солод, сусло, мука или цельнозерновая

крупы, полученные из указанного зерна, содержат ДНК, которая включает аллель в локусе Lys3.

В дополнительном варианте реализации изобретения зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 1% или менее, около 0,01% или менее, около 0,007% или менее, около 0,0027% или менее, от около 0,001 до около 1%, от около 0,001 до около 0,01%, около 0,007 или около 0,0027% концентрации хордеинов по сравнению с зерном из соответствующего растения ячменя дикого типа или солодом, суслом, мукой или цельнозерновой крупой, полученными таким же способом из зерна из соответствующего растения ячменя дикого типа.

В еще одном другом варианте реализации изобретения зерно получено из растения, которое обладает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, от около 60 до 100%, от около 70 до 100%, от около 80 до 100%, около 60, около 70, около 80 или около 90% урожайности зерна растения ячменя дикого типа.

В другом варианте реализации изобретения средняя масса зерновки составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95 или около 100% зерновки растения ячменя дикого типа.

В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, содержат около 10% или менее, около 5% или менее, около 2% или менее, от около 0,1 до около 10% или от около 0,1 до около 10% одного или более одного или всех из следующих компонентов по сравнению с соответствующим растением ячменя дикого типа:

- i) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 53;
- ii) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 54;
- iii) С-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 55;
- iv) D-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 56.

В другом варианте реализации изобретения зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, дополнительно содержат около 10% или менее, около 5% или менее, около 1% или менее, от около 0,1 до около 10% или от около 0,1 до около 10% из следующих компонентов по сравнению с соответствующим растением ячменя дикого типа:

- i) γ -хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 57, и/или
- ii) авениноподобных А-белков, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 52.

В другом варианте реализации изобретения зерно или солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа, полученные из указанного зерна, дополнительно содержат γ 3-хордеин в количестве около 60% или менее по сравнению с количеством в соответствующем растении ячменя дикого типа, γ 3-хордеин, содержащий аминокислоты, последовательность которых представлена как SEQ ID NO: 58, такой как γ 3-хордеин, содержащий аминокислоты, последовательность которых представлена как SEQ ID NO: 83.

Примеры растения ячменя дикого типа включают, но не ограничиваются сортами Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh или Commander.

В другом варианте реализации изобретения содержание крахмала зерна составляет по меньшей мере около 50% (мас./мас). Предпочтительнее содержание крахмала зерна составляет от около 50 до около 70% (мас./мас).

В дополнительном варианте реализации изобретения целиакальная токсичность муки, полученной из данного зерна, составляет менее чем около 5% или менее чем около 1% относительно муки, полученной из зерна соответствующего растения ячменя дикого типа.

В дополнительном варианте реализации изобретения средняя масса зерновки составляет по меньшей мере в 1,05 раза, по меньшей мере в 1,1 раза или от 1,05 до 1,3 раз больше, чем масса зерновки, которая является

- i) гомозиготной по аллели локуса Hor2, в которой большинство или все кодирующие В-хордеины гены удалены,
- ii) гомозиготной по аллели в локусе Lys3 ячменя, что приводит к отсутствию в зерне С-хордеинов,
- iii) гомозиготной по аллели дикого типа D-хордеина, кодирующей полноразмерный белок.

В еще одном дополнительном варианте реализации изобретения зерно получено из растения, которое обладает урожайностью зерна по меньшей мере в 1,20 раз, или по меньшей мере 1,35 раз, или от 1,2 до 1,5 раз, или от 1,2 до 2,0 раз больше, чем урожайность зерна из растения, которое является

- i) гомозиготным по аллели локуса Hor2, в которой большинство или все кодирующие В-хордеины гены удалены,
- ii) гомозиготным по аллели в локусе Lys3 ячменя, что приводит к отсутствию в зерне С-хордеинов,
- iii) гомозиготным по аллели дикого типа D-хордеина, кодирующей полноразмерный белок.

К примеру, принимая во внимание два вышеприведенных варианта реализации изобретения, зерно с признаками, определенными в пп. от i) до iii) может быть зерном G1*, описанным в публикации WO 2009/021285.

В другом варианте реализации изобретения по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% генома зерна ячменя идентично геному ячменя сорта дикого типа, такого как, но не ограниченного, Sloop, Hindmarsh, Oxford или Maratime.

В варианте реализации изобретения зерно получено от нетрансгенного растения.

В альтернативном варианте реализации изобретения зерно получено от трансгенного растения.

В дополнительном варианте реализации изобретения растение содержит трансген, который кодирует полинуклеотид, который подавляет в зерне продукцию по меньшей мере одного хордеина. Предпочтительно полинуклеотид этого варианта реализации изобретения представляет собой антисмысловый полинуклеотид, смысловый полинуклеотид, каталитический полинуклеотид, искусственную микроРНК или дуплексную молекулу РНК, которая подавляет экспрессию одного или предпочтительно более генов, кодирующих хордеины.

В другом варианте реализации изобретения способ включает получение из такого зерна муки или цельнозерновой крупы.

В дополнительном варианте реализации изобретения способ включает получение из такого зерна солода.

В варианте реализации изобретения напиток на основе солода представляет собой пиво, а способ включает проращивание зерна или дробление полученного таким образом зерна. В варианте реализации изобретения способ дополнительно включает фракционирование высушенного пророщенного зерна на две и более фракции эндосперма, фракции эндотелиального слоя, фракции шелухи, фракции проростков и фракции солодовых ростков и соединение и смешивание предопределенных количеств двух или более из этих фракций.

В варианте реализации изобретения по меньшей мере около 50% зерна прорастает в пределах 3 суток после набухания.

В дополнительном варианте реализации изобретения пищевой ингредиент или ингредиент напитка на основе солода представляет собой муку, крахмал, солод или сусло, или пищевой продукт представляет собой хлебопродукты на закваске или без закваски, макаронные изделия, лапшу, сухие завтраки, закусовые пищевые продукты, коржи, кондитерские изделия или продукты, содержащие соусы на основе муки.

В варианте реализации изобретения напиток на основе солода представляет собой пиво или виски.

В варианте реализации изобретения пищевой продукт или напиток на основе солода предназначен для употребления людьми.

В дополнительном варианте реализации изобретения после употребления такого пищевого продукта или напитка по меньшей мере один симптом заболевания целиакией не проявляется у субъекта с указанным заболеванием.

В другом аспекте в данном изобретении представлено растение ячменя, которое производит зерно, содержащее около 50 м.д. или менее хордеинов.

Представлено также зерно растения ячменя по данному изобретению.

Зерно изобретения и/или зерно растения ячменя по данному изобретению может содержать один или более признаков, определенных выше.

В варианте реализации изобретения зерно ячменя способно производить растение ячменя по данному изобретению.

В варианте реализации изобретения зерно перерабатывается таким образом, что оно не способно прорасти.

В варианте реализации изобретения зерно является лишенным оболочки.

В другом аспекте в данном изобретении представлен способ получения зерна ячменя, причем способ включает

- а) выращивание растения ячменя по данному изобретению,
- б) сбор зерна и
- с) необязательно переработку зерна.

В варианте реализации изобретения способ включает выращивание по меньшей мере 10000 растений в полевых условиях на площади по меньшей мере 1 га.

В другом аспекте в данном изобретении представлен способ получения муки, цельнозерновой крупы, крахмала, солода, сусла или другого продукта, получаемого из зерна, причем способ включает:

- а) получение зерна по данному изобретению и
- б) переработку зерна для получения муки, цельнозерновой крупы, крахмала, солода, сусла или другого продукта.

Представлен также продукт, получаемый из растения ячменя по данному изобретению или зерна по данному изобретению.

В одном варианте реализации изобретения продукт представляет собой пищевой ингредиент, ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или продукт-напиток на основе солода.

В варианте реализации изобретения продукт-напиток на основе солода представляет собой пиво

или виски.

В дополнительном варианте реализации изобретения продукт представляет собой непищевой продукт. Примеры включают, но не ограничиваются пленками, покрытиями, адгезивными веществами, строительными материалами и упаковочными материалами.

Также представлен пищевой продукт или напиток на основе солода с использованием способа по данному изобретению.

В другом аспекте изобретения представлено пиво, содержащее один или более белков зерна ячменя и менее 0,9 м.д. хордеинов.

В варианте реализации изобретения пиво содержит по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4% или по меньшей мере около 5% этанола.

В другом аспекте в данном изобретении представлена мука или цельнозерновая крупа, содержащая один или более белков зерна ячменя и менее чем около 50 м.д. или менее чем около 20 м.д. хордеинов.

В другом аспекте в данном изобретении представлен солод или сусло, содержащие один или более белков зерна ячменя и менее чем около 50 м.д. или менее чем около 20 м.д. хордеинов.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен метод идентификации аллели гена D-хордеина ячменя, которая кодирует усеченный D-хордеин, причем способ включает

- i) получение образца, содержащего нуклеиновую кислоту из растения ячменя, и
- ii) проведение анализа образца на наличие или отсутствие остатка гуанина в положении 450 открытой рамки считывания, кодирующей D-хордеин,

причем наличие гуанина указывает на то, что ген D-хордеина кодирует усеченный D-хордеин.

В варианте реализации изобретения этап b) включает амплификацию геномной ДНК с использованием праймеров GGCAATACGAGCAGCAAAC SEQ ID NO: 66 и CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC SEQ ID NO: 67 или вариант одного или их обоих и приведение в контакт продуктов амплификации с ферментом рестрикции KpnI, причем отсутствие расщепления указывает на то, что ген D-хордеина кодирует усеченный D-хордеин.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен способ предотвращения или уменьшения частоты возникновения или тяжести заболевания целиакией у субъекта, причем способ включает пероральное введение субъекту пищевого продукта или напитка на основе солода по данному изобретению или зерна по данному изобретению, при этом уменьшение частоты возникновения или тяжести заболевания целиакией сравнивается с тем, когда субъекту перорально вводится такое же количество соответствующего пищевого продукта или напитка на основе солода, приготовленного из зерна ячменя дикого типа.

Представлено также применение пищевого продукта или напитка на основе солода по данному изобретению или зерна по данному изобретению для производства пищевого продукта или напитка для перорального введения субъекту для предотвращения или уменьшения частоты возникновения или тяжести заболевания целиакией.

В дополнительном аспекте в данном изобретении представлен способ идентификации ячменного зерна, которое может применяться для получения пищевого продукта и/или напитка на основе солода для употребления субъектом с заболеванием целиакией, включающий

- a) получение одного или более из следующих материалов:
 - i) образца из растения, способного производить указанное зерно,
 - ii) зерна,
 - iii) солода, полученного из этого зерна, и/или
 - iv) экстракта из указанного зерна;
- b) проведение анализа материала из этапа a) для определения концентраций В, С и D-хордеинов, пептидов, полученных из В, С и D-хордеинов, и/или аллелей генов В, С и D-хордеинов;
- c) отбор зерна, которое содержит около 50 м.д. или менее хордеинов, для получения пищевого продукта и/или напитка на основе солода для употребления субъектом с заболеванием целиакией.

В варианте реализации изобретения материал из этапа a) содержит геномную ДНК и на этапе b) включает идентификацию наличия или отсутствия аллелей генов, кодирующих один, или более, или все из

- i) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 53;
 - ii) В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 54;
 - iii) С-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 55;
 - iv) D-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 56,
- причем отсутствие аллелей выявляет зерно, которое содержит около 50 м.д. или менее хордеинов.

Любой вариант реализации изобретения должен приниматься в отношении любого другого варианта реализации изобретения для осуществления *mutatis mutandis*, если только специально не указано иное.

Данное изобретение не должно ограничиваться в объеме специальными вариантами реализации изобретения, которые предназначены только для целей иллюстрации. Функционально эквивалентные продукты, составы и способы безусловно находятся в пределах объема изобретения, как описано в данном документе.

Во всем этом описании, если специально не указано иное или контекстом требуется противополож-

ное, ссылка на один этап, состав веществ, группу этапов или группу составов веществ должна восприниматься как охватывающая один элемент или множество (т.е. один или более) из этих этапов, составов веществ, групп этапов или группы составов веществ.

Данное изобретение в дальнейшем описывается с помощью следующих неограничивающих примеров и с ссылками на сопровождающие фигуры.

Краткое описание сопровождающих графических материалов

Фиг. 1 - схематическое представление хромосомы 1 ячменя.

Фиг. 2 - относительное количественное содержание хордеинов в видах пива.

Площадь пиков выбранных пептидов, представляющих наиболее распространенные хордеины или родственные полипептиды, обнаруженные в пиве:

(A) QQCCQPLAQISEQAR (SEQ ID NO: 5), представляющий авениноподобный А-белок;

(B) VFLQQQCSPVR (SEQ ID NO: 53), представляющий В1-хордеин;

(C) VFLQQQCSPVMPQR (SEQ ID NO: 54), представляющий В3-хордеин;

(D) ELQESSLEACR (SEQ ID NO: 56), представляющий D-хордеин;

(E) QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 58), представляющий γ -хордеин-3.

Эти представляющие пептиды применены для иллюстрации относительного количества основных белков хордеинов в видах пива дикого типа (Sloop) и двух видов с делецией хордеинов, приготовленных из сортов Risø 56 и Risø 1508 соответственно, и в 60 коммерческих видах пива. Малая площадь пика наблюдалась для безглютеновых видов пива 17, 47, 49-52, 54 из-за низкого уровня шума в сигнале, а не из-за детекции хордеина.

Фиг. 3 - сравнение аминокислотных последовательностей D-хордеина из сортов Sloop (дикий тип) и Ethiopia R118 (нулевой).

Фиг. 4 - сравнение аминокислотных и кодирующих нуклеотиды последовательностей D-хордеина из сортов Sloop (дикий тип) и Ethiopia R118 (нулевой). Положение праймеров для детекции каждой аллели показано вместе с сайтом расщепления Kpn1, представленным только в последовательности дикого типа.

Фиг. 5 - определение содержания хордеина линий ULG3.0 методом MRM-МС по площади пика и показывающее процентное содержание относительно сорта Sloop (100%).

Фиг. 6 - определение содержания хордеина линий ULG3.0 методом MRM-МС по площади пика и показывающее процентное содержание относительно сорта Sloop (100%).

Фиг. 7 - определение содержания хордеина пива из ULG3.0 методом MRM-МС в виде площади пика для определенных пептидов. Показаны площади пиков и процентное содержание относительно сорта Sloop (100%).

Фиг. 8 - детекция хордеинов и хордеиноподобных белков методом MRM-МС в муке из перспективных линий ULG3.0 (T2-4-8) и ULG3.2 по сравнению с разновидностями дикого типа Sloop, Baudin, Commander и Hindmarsh. На каждом графике показано среднее значение $\pm$ CO для суммарной площади пиков (3 MRM-перехода) для представляющего пептида из каждого семейства хордеинов. В каждом случае пептид (последовательность, которая указана на графике) картируется любым из авениноподобного А-белка, В1-, В3-, С-, D-, γ 1- или γ 3-хордеина. Номер доступа в базе данных Uniprot приведен в легенде (например, F2EGD5 для первого примера).

Определитель к перечню последовательностей

SEQ ID NO: 1 и 4 - пептиды α -глиаина пшеницы.

SEQ ID NO: 2, 3, от 6 до 11, от 16 до 59 и 85 - пептиды хордеинов ячменя.

SEQ ID NO: 5 - авениноподобный А-пептид пшеницы.

SEQ ID NO: от 12 до 15 - пептиды проламинов ржи.

SEQ ID NO: от 60 до 71 - олигонуклеотидные праймеры.

SEQ ID NO: 72 - геномный участок, кодирующий D-хордеин сорта Sloop ячменя.

SEQ ID NO: 73 - геномный участок, кодирующий D-хордеин сорта Ethiopia R118 (нулевой).

SEQ ID NO: 74 - D-хордеин сорта Sloop ячменя.

SEQ ID NO: 75 - D-хордеин сорта Ethiopia R1118 ячменя.

SEQ ID NO: 74 - D-хордеин сорта Sloop ячменя.

SEQ ID NO: 75 - D-хордеин сорта Ethiopia R118 ячменя.

SEQ ID NO: 76 - открытая рамка считывания, кодирующая хордеин D сорта Sloop ячменя.

SEQ ID NO: 77 - открытая рамка считывания, кодирующая хордеин D сорта Ethiopia R118 ячменя.

SEQ ID NO: 78 - пример В1-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: Q40020).

SEQ ID NO: 79 - пример В3-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: Q4G3S1).

SEQ ID NO: 80 - пример С-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: Q40055).

SEQ ID NO: 81 - пример γ 1-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: P17990).

SEQ ID NO: 82 - пример γ 2-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: Q70IB4).

SEQ ID NO: 83 - пример γ 3-хордеина ячменя дикого типа (номер доступа: P80198).

SEQ ID NO: 84 - пример авениноподобного А-белка (номер доступа: F2EGD5).

Подробное описание изобретения

Общие методики и определения

Если специально не определено иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, должны приниматься как имеющие такие же значения, как обычно понимаемые средним специалистом в данной области техники (например, в растениеводстве, пищевой технологии, культивировании клеток, молекулярной генетике, иммунологии, белковой химии и биохимии).

Если не указано противоположное, методики работы с рекомбинантным белком, культивирование клеток и иммунологические методики, используемые в данном изобретении, являются стандартными процедурами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Такие методики описаны и разъяснены повсюду в литературе, в таких источниках как J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 и 2, IRL Press (1991), D.M. Glover и B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 и 1996) и F.M. Ausubel et al. (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates и Wiley-Interscience (1988, включая все переиздания до настоящего времени), Ed Harlow и David Lane (editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) и J.E. Coligan et al. (editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (включая все переиздания до настоящего времени).

Используемый в данном документе термин "ячмень" относится к любым видам рода *Hordeum*, включая их предшественников, а также их потомство, полученное скрещиванием с другими видами. Предпочтительной формой ячменя является вид *Hordeum vulgare*. Зерно большинства сортов ячменя, выращиваемых сегодня в мире в коммерческих масштабах, имеет покрытые (с оболочкой) зерновки, в которых так называемая оболочка, которая составляет внешнюю лемму и внутреннюю чешую, в зрелом состоянии соединена с эпидермисом перикарпа. Другие сорта, называемые "лишенные оболочки" или "голозерные" ячмени, свободно обмолачиваются, и оболочки легко удаляются в процессе молочения. Голозерное ячменное зерно предпочтительно для употребления людьми, хотя зерно с оболочкой может использоваться после шелушения, поскольку ячменное зерно с оболочкой предпочтительно для пивоваренной промышленности и для питания животных. Признак лишнего оболочки зерна контролируется единственным рецессивным геном, обозначенным *nud*, расположенным на длинном плече хромосомы 7Н (Kikuchi et al., 2003).

Заболевание целиакией или глютеновая болезнь представляет собой аутоиммунное нарушение тонкого кишечника, которое встречается у генетически предрасположенных индивидов во всех возрастных группах после периода раннего детства. Оно поражает приблизительно 1% индоевропейской популяции, хоть и в значительной степени редко диагностируется. Заболевание целиакией вызвано реакцией на белок глиадин, глютен, обнаруженный в пшенице (и сходных белках растений *Triticaceae*, которые включают другие виды, такие как ячмень и рожь). При воздействии глиадина фермент тканевая трансглутаминаза модифицирует белок, а иммунная система перекрестно реагирует с тканью кишечника, вызывая воспалительную реакцию. Этот процесс приводит к уплощению слизистой оболочки тонкого кишечника, которое нарушает абсорбцию питательных веществ. Единственным эффективным методом лечения является продолжающаяся всю жизнь безглютеновая диета. Это патогенное состояние имеет несколько других названий, включающих заболевание *coeliac* (с лигатурой), *спру-целиаксия*, *нетрофическая спру*, *эндемическая спру*, *глютеновая энтеропатия* или *глютензависимая энтеропатия* и *непереносимость глютена*. Симптомы заболевания целиакией в широком диапазоне отличаются между разными людьми. Симптомы заболевания целиакией могут включать один или более из следующих: образование газов, периодическое вздутие и боль, хроническая диарея, запор, бледность, неприятный запах или масляный стул, потеря массы/набор массы тела, чувство усталости, анемия невыясненной этиологии (низкое число красных кровяных клеток, вызывающее чувство усталости), боль в костях и суставах, остеопороз, остеопения, изменение поведения, ощущение онемения в ногах (из-за повреждения нервов), мышечные судороги, конвульсии, перебои с менструальными циклами (часто из-за интенсивной потери массы), бесплодие, привычное невынашивание, задержка роста, снижение прибавки массы тела у грудных детей, бледные язвы на слизистой рта, называемые афтозными язвами, обесцвечивание зубов или потеря эмали и зудящая сыпь на коже, называемая герпетиформным дерматитом. Некоторые из более частых симптомов включают утомляемость, рецидивирующую диарею, боль в животе или судороги, несварение, вздутие кишечника, вздутие живота и потеря массы. Заболевание целиакией может диагностироваться, к примеру, как описано в публикации WO 01/025793.

Как используется в данном документе, термин "нулевая аллель гена, кодирующего D-хордеин в локусе *Hor3*", относится к любой аллели этого локуса, которая не кодирует белок D-хордеин или, если белок кодируется, он не является иммуногенным для субъекта с заболеванием целиакией (такой как усеченный D-хордеин, представленный на фиг. 3).

Как используется в данном документе, термин "отсутствие", используемый в данном документе в контексте декларируемого вещества, означает, что это вещество удалено из зерна ячменя или продукта, полученного из него, по данному изобретению или что вещество не обнаружено в зерне или продукте по

данному изобретению, когда выполняются анализы на содержание этого вещества с использованием метода, известного в данной области техники. Иначе говоря, вещество может присутствовать в концентрации, которая недостаточна для обнаружения, или она находится в пределах стандартной ошибки для анализа на это вещества. К примеру, в контексте декламируемого хордеина термин "отсутствие" означает, что специфический хордеин не обнаруживается в анализе, таком как, к примеру, анализ MRM-МС, анализ ИФА или анализ 2D-гель-электрофореза, такие как приведенные в данном документе. Вещество, которое отсутствует, может быть не обнаруживаемым при выполнении одного вида анализа или нескольких видов анализов. Необходимо понимать, что вещество, которое указано как отсутствующее в зерне или продукте по данному изобретению, присутствует в соответствующем зерне или продукте из растения дикого типа, как легко определяется анализом, известным в данной области техники.

Как используется в данном документе, термин "хордеин", к примеру, когда используется во фразе "около 50 м.д. или менее хордеинов" и сходных фразах, относится к общему содержанию хордеинов, включающему В-, С-, D- и γ -хордеины.

Термины "семя" и "зерно" применяются в данном документе взаимозаменяемо. "Зерно" в большинстве случаев относится к зрелому собранному зерну, но также может относиться к зерну после переработки, такой как, к примеру, измельчение или шелушение, когда большинство зерен остается неповрежденными, или после набухания или прорастания, в соответствии с контекстом. Зрелое зерно зачастую имеет содержание влаги менее чем около 18-20%. Зерно ячменя дикого типа (цельное зерно) в большинстве случаев содержит 9-12% белка и около 30-50% из него, как правило 35%, является протамином, таким образом, зерно ячменя дикого типа содержит по массе около 3-4% проламина. Проламины обнаружены практически исключительно в эндосперме, который составляет около 70% массы цельного зерна.

Как используется в данном документе, термин "уборочный индекс" относится к массе собранного зерна и выражается как процентное содержание зерна к общей массе растения.

Как используется в данном документе, термин "соответствующее дикому типу" растение ячменя относится к растению, которое содержит по меньшей мере 50%, предпочтительнее по меньшей мере 75%, предпочтительнее по меньшей мере 95%, предпочтительнее по меньшей мере 97%, предпочтительнее по меньшей мере 99% и еще предпочтительнее 99,5% генотипа растения по данному изобретению, но производит зерно с немодифицированным содержанием хордеинов. В одном варианте реализации изобретения "соответствующее дикому типу" растение ячменя представляет собой сорт, используемый в экспериментах в растениеводстве для внедрения генетических вариантов, что приводит к уменьшенной продукции хордеинов в зерне. В другом варианте реализации изобретения "соответствующее дикому типу" растение ячменя представляет собой исходный сорт, в который внедрен трансген, который уменьшает продукцию хордеинов в зерне. В дополнительном варианте реализации изобретения "соответствующее дикому типу" растение ячменя представляет собой сорт, который применяется на момент подачи заявки для коммерческого производства зерна ячменя, такой как, но не ограниченный сортами

Bomi, Sloop, Carlsberg II, K8, L1, Vlamingsh.

Stirling, Hamelin, Schooner, Baudin, Commander, Gairdner, Buloke, W13586-1747, W13416, Flagship, Cowabbie, Franklin, SloopSA, SloopVic, Quasar, VB9104, Grimmett, Cameo*Arupo 31-04, Prior, Schooner, Unicorn, Harrington, Torrents, Gallcon, Morex, Dhow, Capstan, Fleet, Keel, Maritime, Yarra, Dash, Doolup, Fitzgerald, Molloy, Mundah, Oxford, Onslow, Skiff, Unicorn, Yagan, Chebec, Hindmarsh, Chariot, Diamant, Korál, Rubín, Bonus, Zenit, Akcent, Forum, Amulet, Tolar, Heris, Maresi, Landora, Caruso, Miralix, Wikingett Brise, Caruso, Potter.

Pasadena, Annabell, Maud, Extract, Saloon, Prestige, Astoria, Elo, Cork, Extract, Laura.

В варианте реализации изобретения "соответствующее дикому типу" растение ячменя производит зерно с немодифицированным содержанием хордеинов, поскольку оно содержит полный набор функциональных генов хордеинов, кодирующих функциональные белки хордеины, включающие В, С, D и γ -хордеины, кодированные локусами *Hor2*, *Hor1*, *Hor3* и *Hor5*.

Как используется в данном документе, термин "один или более белков зерна ячменя" относится к встречающимся в природе белкам, продуцируемым зерном ячменя, отличающимся от хордеинов. Примеры таких белков известны специалистам в данной области техники. Специальные примеры включают (но не ограничиваются) альбумины ячменя, такие как белок 1 переноса липидов массой 9 кДа (LTP1) (см. Douliez et al. (2000) для обзора и, например, имеющий № доступа базы данных Swiss-prot № P07597), ингибиторы α -амилазы/трипсина (CMd, CMb, CMa), белок Z (см. Brandt et al. (1990) и номер доступа базы Genbank № P06293) и белки, идентифицированные в статье Colgrave et al. (2012), включая их процессированные (зрелые) формы, а также денатурированные формы и/или их фрагменты, образовавшиеся в результате получения солода, муки, цельнозерновой крупы, пищевого продукта или напитка на основе солода по данному изобретению.

Как используется в данном документе, "среднюю массу зерновки" предпочтительно определяют получением по меньшей мере 25, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100, предпочтительнее около

100 отдельных зерен из растения (или генетически идентичных растений, выращенных в одинаковых условиях) и определением средней массы зерна.

Как используется в данном документе, термин "солод" применяется в отношении ячменного солода, "мука" - в отношении ячменной муки, "цельнозерновая крупа" - в отношении ячменной цельнозерновой крупы, а "пиво" - в отношении пива, которое получено с использованием ячменя в качестве основного ингредиента, обеспечивающего ферментируемые углеводы, за исключением того, что солод, мука, цельнозерновая крупа или пиво явно указаны как происходящие из источника, отличающегося от ячменя. Как используется в данном документе, "сусло" относится к жидкости, экстрагированной в процессе затирания во время получения пива или виски. Сусло содержит сахара, которые будут ферментированы сбраживающими дрожжами для продукции спирта. Конкретнее, источник солода, сусла, муки, пива, цельнозерновой крупы, пищевого продукта и т.п. по данному изобретению получен при переработке (к примеру, измельчении и/или ферментации) зерна ячменя. Зерно, солод, сусло, мука, цельнозерновая мука или пиво по данному изобретению могут перемешиваться или смешиваться с зерном, солодом, суслом, мукой, цельнозерновой крупой или пивом, которые получены из ячменя. Эти термины включают солод, сусло, муку, пиво, цельнозерновую крупу, пищевой продукт и т.п., полученные из смеси зерен, включающей ячмень. В предпочтительном варианте реализации изобретения по меньшей мере 10% или по меньшей мере 50% зерна, применяемого для получения солода, сусла, муки, пива, цельнозерновой крупы, пищевого продукта и т.п., является ячменным зерном.

Термин "растение", как используется в данном документе в качестве существительного, относится к целому растению, такому как, к примеру, растению, выращенному в полевых условиях для коммерческого производства ячменя. "Часть растения" относится к растительным вегетативным структурам (к примеру, листьям, стеблям), корням, цветковым органам/структурам, семени (включая эмбрион, эндосперм и оболочку семени), растительной ткани (к примеру, сосудистая ткань, покровная ткань и тому подобное), клеткам, гранулам крахмала или такому же потомству.

"Трансгенное растение", "генетически модифицированное растение" или их вариации относятся к растению, которое содержит генную конструкцию ("трансген"), не обнаруженную в растении дикого типа такого же вида, разновидности или сорта. "Трансген", как отмечено в данном документе, имеет обычное значение в области биотехнологии и включает генетическую последовательность, которая получена или изменена с помощью технологии рекомбинантной ДНК или РНК и которая внедрена в клетку растения. Трансген может содержать генетическую последовательность, полученную из растительной клетки. Как правило, трансген внедряется в растение путем манипуляции человека, такой как, к примеру, трансформация, но может быть использован любой способ, признанный специалистом в данной области техники.

"Молекула нуклеиновой кислоты" относится к полинуклеотиду, такому как, к примеру, ДНК, РНК или олигонуклеотиды. Она может быть ДНК или РНК геномного или синтетического происхождения, двухцепочечной или одноцепочечной, и сочетаться с углеводом, липидами, белком или другими веществами для выполнения конкретного действия, определенного в данном документе.

Термин "функционально связанный", как используется в данном документе, относится к функциональной связи между двумя или более сегментами нуклеиновых кислот (например, ДНК). Как правило, он относится к функциональной связи транскрипционного регуляторного элемента (промотора) с транскрибируемой последовательностью. К примеру, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, такой как полинуклеотид, определенный в данном документе, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке. В большинстве случаев, транскрипционные регуляторные элементы промоторов, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически расположены последовательно с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются *cis*-действующими. Тем не менее, некоторые транскрипционные регуляторные элементы, такие как энхансеры, не требуют последовательного физического расположения или расположены в непосредственной близости с кодирующими последовательностями, транскрипцию которых они усиливают.

Как используется в данном документе, термин "ген" должен приниматься в своем самом широком контексте и включает дезоксирибонуклеотидные последовательности, содержащие кодирующий белок участок структурного гена и включающие последовательности, расположенные по соседству с кодирующим участком на обоих 5'- и 3'-концах на расстоянии по меньшей мере около 2 т.н. на любом конце, который участвует в экспрессии гена. Последовательности, которые расположены на 5'-конце кодирующего участка и которые представлены на мРНК, называются 5'-нетранслируемыми последовательностями. Последовательности, которые расположены на 3'-конце или в прямом направлении кодирующего участка и которые представлены на мРНК, называются 3'-нетранслируемыми последовательностями. Термин "ген" охватывает как кДНК так и геномные формы гена. Геномная форма или клон гена содержит кодирующий участок, который может прерываться некодирующими последовательностями, называемыми "интронами", или "промежуточными участками", или "промежуточными последовательностями". Интроны представляют собой сегменты гена, которые транскрибируются в ядерные РНК (hnRNA); интроны могут содержать регуляторные элементы, такие как энхансеры. Интроны удаляются или "сплай-

сируются" из ядерного или первичного транскрипта; следовательно, интроны отсутствуют в транскрипте матричной РНК (мРНК). мРНК функционирует во время трансляции для определения последовательности или порядка аминокислот в образующемся полипептиде. Термин "ген" включает синтетическую или гибридную молекулу, кодирующую все или часть белков по данному изобретению, описанных в данном документе, и комплементарную нуклеотидную последовательность к любому из вышеуказанных элементов.

Как используется в данном документе, термин "другой ингредиент пищевого продукта или напитка" относится к любому веществу, подходящему для потребления животным, предпочтительно любому веществу, подходящему для употребления человеком, при использовании в виде части пищевого продукта или напитка. Примеры включают (но не ограничиваются) зерно из другого вида растений, сахар и т.п., но исключают воду.

Растения по данному изобретению, как правило, имеют одну или более генетических вариаций, каждая из которых приводит к уменьшенному содержанию по меньшей мере одного хордеина, предпочтительнее по меньшей мере В, С и D-хордеинов. Как используется в данном документе, термин "генетическая вариация, каждая из которых приводит к уменьшенному содержанию по меньшей мере одного хордеина" относится к любому полиморфизму растения ячменя, который уменьшает продукцию хордеина. Генетическая вариация может содержать, к примеру, делецию хордеинового(ых) гена(ов), или его(их) части, или мутацию, которая уменьшает транскрипцию гена ячменя. Примеры таких генетических вариаций представлены в линиях Risø 56, Risø 527 и Risø 1508, и Ethiopia R118. По этой причине такие растения могут применяться как исходные растения для получения растений по данному изобретению. Растение по данному изобретению может происходить из потомства от перекрестного скрещивания между любыми из этих мутантов ячменя. В предпочтительном варианте реализации изобретения растение по данному изобретению не является потомством от перекрестного скрещивания между линиями Risø 56 и Risø 1508, содержащими мутации *hor2* и *Lys3*, присутствующими в этих линиях, и которое является диким типом по гену, кодирующему D-хордеин. В варианте реализации изобретения растение кодирует γ 3-хордеин, содержащий аминокислоты, последовательность которых представлена как SEQ ID NO: 58, такая как γ 3-хордеин, содержащий аминокислоты, последовательность которых представлена как SEQ ID NO: 83. Например, растение может иметь функциональный ген γ 3-хордеина дикого типа, такой как ген γ 3-хордеина сорта ячменя Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh или Commander. В варианте реализации изобретения растение не является потомством от перекрестного скрещивания между линиями Risø 527 и Risø 1508.

Как используется в данном документе, если не указано противоположное, фраза "около" относится к любому обоснованному диапазону в свете обсуждаемого значения. В предпочтительном варианте реализации изобретения термин "около" относится к $\pm 10\%$, предпочтительнее $\pm 5\%$, предпочтительнее $\pm 1\%$ от определяемого значения.

Если не определено иное, в отношении массы и процентного содержания единицами измерения являются мас./мас.

Термин "и/или", например "X и/или Y", должен пониматься как обозначение или "X и Y" или "X или Y" и должен приниматься как представление явного подкрепления обоих обозначений или любого обозначения.

Во всем объеме этого описания слово "включение" или такие вариации как "включает" или "включающий" должны пониматься как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа, или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа, или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов.

Проламины и хордеины

Проламины зерновых культур (известные как глиадины в пшенице, хордеины в ячмене, секалины в ржи, авенины в овсе и зеины в кукурузе) являются основными запасными белками эндосперма во всех зернах злаков, за исключением овса и риса (Shewry и Halford, 2002). Хордеины представляют 35-50% от общего содержания белка в ячмене (Jaradat, 1991). Они классифицированы по четырем группам А (также известным как γ -хордеин, В, С и D, в порядке уменьшения подвижности (Field et al., 1982). В, С, D и γ -хордеины кодируются локусами *Hor2*, *Hor1*, *Hor3* и *Hor5* соответственно на хромосоме 1Н, которая схематически представлена на фиг. 1.

В-хордеины представляют собой основную белковую фракцию, отличаются от С-хордеинов по их содержанию серы (Kreis и Shewry, 1989). В-хордеины отвечают за 70-80% общего содержания, а С-хордеины - за 10-20% (Davies et al., 1993). А-хордеины в большинстве случаев не рассматриваются представляющими запасную фракцию, тогда как D-хордеины гомологичны глютеинам с высокой молекулярной массой. Хордеины вместе с остальными родственными проламинами зерновых культур не экспрессируются в самом зиготном эмбрионе, в отличие от других запасных белков, таких как напинны; предполагается, что они экспрессируются исключительно в крахмалистом эндосперме во время средне-поздних стадий развития семян.

Примеры аминокислотных последовательностей хордеинов ячменя и кодирующих их генов пред-

ставлены в публикации WO 2009/021285.

Осолаживание

Напиток на основе солода, представляемый данным изобретением, охватывает алкогольные напитки (включая напитки, полученные перегонкой) и безалкогольные напитки, которые получают с использованием солода как части или всего исходного сырья. Примеры включают пиво, хаппошу (пивной напиток с низким содержанием солода), виски, слабоалкогольные напитки на основе солода (например, напитки на основе солода, содержащие менее 1% спирта) и безалкогольные напитки.

Осолаживание представляет собой процесс контролируемого замачивания и проращивания с последующим высушиванием зерна ячменя. Эта последовательность превращений важна для синтеза многочисленных ферментов, которые вызывают модификацию зерна, процесс, который главным образом деполимеризует стенки мертвых клеток эндосперма и мобилизует питательные вещества зерна. В последующем процессе высушивания благодаря химическим реакциям обжаривания создается вкус, аромат и цвет. Несмотря на первоначальное применение солода для получения напитков, он также может использоваться для других производственных процессов, к примеру как источник ферментов в хлебопекарной промышленности или как вкусовое ароматизирующее или красящее вещество в пищевой промышленности, к примеру в качестве солода или солодовой муки или опосредованно как солодовый сироп и т.п.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к способам получения солодового состава. Способ предпочтительно включает следующие этапы:

- (i) получение зерна растения ячменя по изобретению,
- (ii) замачивание указанного зерна,
- (iii) проращивание замоченных зерен в predetermined условиях и
- (iv) высушивание указанных проросших зерен.

К примеру, солод может производиться любым из способов, описанных в издании Hosenev (Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition, 1994: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.). Тем не менее, любой подходящий способ получения солода также может использоваться с данным изобретением, такие как способы получения специальных солодов, включающие (но не ограниченные) способы обжаривания солода. Одним не ограничивающим примером является описанный в примере 6.

Солод может готовиться только с использованием зерна, полученного из растений ячменя по данному изобретению, или смесей, содержащих другие зерна.

Солод в основном используется для производства пива, но также для производства крепких напитков, получаемых перегонкой. Производство пива включает получение сусла, основную и вторичную ферментации и выдерживание. Сначала солод измельчают, замешивают с водой и подогревают. Во время этого "затириания" ферменты, активированные в процессе осолаживания, разрушают крахмал зерен в ферментируемые сахара. Полученное сусло осветляют, добавляют дрожжи, смесь ферментируют и проводят выдерживание.

В другом варианте реализации изобретения составы сусла могут готовиться из солода. Указанное сусло может быть первичным, и/или вторичным, и/или дополнительным суслом. В общем, состав сусла будет иметь высокое содержание аминокислот азота и ферментируемых углеводов, главным образом мальтозы. Как правило, сусло готовят инкубированием солода с водой, т.е. затирианием. Во время затириания состав солод/вода может дополняться дополнительными богатыми углеводами составами, к примеру добавками из ячменя, кукурузы или риса. Неосоложенные добавки из зерновых культур обычно не содержат активных ферментов, и поэтому полагаются на ферменты солода или экзогенные ферменты для обеспечения ферментами, необходимыми для конверсии сахаров.

В общем, первым этапом в процессе получения сусла является измельчение солода для того, чтобы вода могла получить доступ к частицам зерна в фазе затириания, которое существенно влияет на длительность процесса осолаживания с ферментной деполимеризацией субстратов. Во время затириания измельченный солод инкубируют с жидкой фракцией, такой как вода. Температуру или поддерживают постоянной (изотермическое затириание) или постепенно повышают. В любом случае растворимые вещества, полученные при осолаживании и затириании, экстрагируются в указанную жидкую фракцию перед их отделением фильтрацией в сусло, а оставшиеся твердые частицы называются пивной дробинкой. Это сусло также может называться первичным суслом. После фильтрации получают вторичное сусло. Дополнительные сусла могут получаться повторением этой процедуры. Не ограничивающие примеры подходящих процедур для приготовления сусла описаны в издании Hosenev (выше).

Состав сусла также может готовиться инкубированием растений ячменя по данному изобретению или их частей с одним или более подходящих ферментов, таких как ферментные составы или смешанные ферментные составы, к примеру Ultraflo или Cereflo (Novozymes). Состав сусла также может готовиться с использованием смеси солода и неосоложенных растений ячменя или их частей, необязательно добавлением одного или более подходящих ферментов во время указанного приготовления. В дополнение к этому ферменты пролилэндопептидазы, которые специфически разрушают токсичные аминокислоты, участвующие в проявлении заболевания целиакией, могут добавляться во время ферментации сусла для уменьшения токсичности остаточных хордеинов (De Angelis et al., 2007; Marti et al., 2005; Stepniak et al., 2006).

Переработка зерна

Зерно ячменя по данному изобретению может перерабатываться для получения пищевого ингредиента, ингредиента напитка, пищевого продукта, или напитка, или непищевого продукта с использованием любой технологии, известной в данной области техники.

В одном варианте реализации изобретения продукт представляет собой цельнозерновую муку (цельнозерновая мука сверхтонкого помола, такая как цельнозерновая мука сверхтонкого помола; цельнозерновая мука или мука, изготовленная на около 100% из зерна). Цельнозерновая мука включает компонент рафинированной муки (рафинированной муки или рафинированная мука) и крупную фракцию (крупная фракция сверхтонкого помола).

Рафинированная мука может быть мукой, которую получают, к примеру, перемалыванием и просеиванием очищенного ячменя. Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) требует, чтобы мука соответствовала определенным стандартам по размеру частиц для того, чтобы быть включенной в категорию рафинированной муки ячменя. Размер частиц рафинированной муки описывает муку, в которой не более 98% проходит через ткань, имеющую отверстия не более таких у проволоочной ткани, обозначенной "212 мкм (стандарт U.S. Wire 70)".

Крупная фракция включает по меньшей мере один из компонентов: отруби и зародыши. К примеру, зародыш представляет собой эмбриональное растение, находящееся внутри зерна ячменя. Зародыш включает липиды, волокна, витамины, белок, минеральные вещества и фитонутриенты, такие как флавоноиды. Отруби включают несколько слоев клеток и имеют значительное количество липидов, волокон, витаминов, белка, минеральных веществ и фитонутриентов, таких как флавоноиды. Дополнительно крупная фракция может включать алейроновый слой, который также включает липиды, волокна, витамины, белок, минеральные вещества и фитонутриенты, такие как флавоноиды. Алейроновый слой в то же время технически считается частью эндосперма, проявляет множество тех же свойств, что и отруби, и поэтому, как правило, удаляется с отрубями и зародышем во время процесса измельчения. Алейроновый слой содержит белки, витамины и фитонутриенты, такие как феруловая кислота.

Дополнительно крупная фракция может смешиваться с компонентом рафинированной муки. Предпочтительно крупная фракция может гомогенно смешиваться с компонентом рафинированной муки. Гомогенное смешивание крупной фракции и компонента рафинированной муки может помочь в уменьшении расслоения частиц по размеру при перевозке. Грубая фракция может смешиваться с компонентом рафинированной муки с образованием цельнозерновой муки, обеспечивая таким образом получение цельнозерновой муки с увеличенной питательной ценностью, содержанием волокон и антиоксидантной способностью по сравнению с рафинированной мукой. К примеру, крупная фракция или цельнозерновая мука может применяться в различных количествах для замены рафинированной или цельнозерновой муки в хлебобулочных изделиях, закусочных продуктах и пищевых продуктах. Цельнозерновая мука по данному изобретению (т.е. цельнозерновая мука сверхтонкого помола) также может реализовываться непосредственно потребителям для использования в приготовлении домашних мучных изделий. В типовом варианте реализации изобретения профиль крупности цельнозерновой муки такой, что 98 мас.% частиц цельнозерновой муки составляет менее 212 мкм.

В дополнительных вариантах реализации изобретения ферменты, находящиеся внутри отрубей и зародышей цельнозерновой муки и/или крупной фракции, инактивируются для того, чтобы стабилизировать цельнозерновую муку и/или крупную фракцию. Данным изобретением подразумевается, что "инактивированный" также может означать "ингибированный", "денатурированный" или тому подобное. Стабилизация представляет собой процесс, в котором используется пар, нагрев, радиация или другие виды обработки для инактивации ферментов, находящихся в слое отрубей или зародышей. Встречающиеся в природе ферменты в отрубях и зародышах будут катализировать изменения соединений в муке, неблагоприятно влияя на кулинарные свойства муки и срок годности. Инактивированные ферменты не катализируют изменения соединений, находящихся в муке, поэтому мука, которую стабилизировали, сохраняет свои кулинарные свойства и имеет более длительный срок годности. К примеру, в данном изобретении может применяться двухпоточная методика измельчения для перемалывания крупной фракции. Сразу крупная фракция отделяется и стабилизируется, потом крупная фракция перемалывается на измельчителе, предпочтительно на вальцовой мельнице, с образованием крупной фракции, имеющей распределение по размерам частиц менее или равных около 500 мкм. В типовом варианте реализации изобретения окружная скорость вальцовой мельницы обычно составляет от 115 до 144 м/с, при высокой окружной скорости образуется тепло. Выделяемое во время процесса тепло и поток воздуха приводят к уменьшению микробной нагрузки крупной фракции. В дополнительных вариантах реализации изобретения перед перемалыванием на вальцовой мельнице крупная фракция может иметь число аэробных микроорганизмов при посеве на чашки 95000 колониеобразующих единиц/г (КОЕ/г), а среднее число колиформ - 1200 КОЕ/г. После прохождения через вальцовую мельницу крупная фракция может иметь среднее число аэробных микроорганизмов при посеве на чашки 10000 КОЕ/г, а среднее число колиформ - 900 КОЕ/г. Таким образом, микробная нагрузка может быть заметно уменьшена в крупной фракции по данному изобретению. После просеивания любая перемолотая крупная фракция, имеющая размер частиц более 500 мкм, может быть возвращена в процесс для дальнейшего измельчения.

В дополнительных вариантах реализации изобретения цельнозерновая мука или крупная фракция может быть компонентом пищевого продукта. К примеру, пищевой продукт может быть бубликом, бисквитом, хлебом, булочкой, круассаном, пельменем, английским кексом, кексом, хлебом пита, квикбредом, охлажденными/замороженными тестовыми заготовками, тестом, тушеной фасолью, буррито, чили, тако, тамалом, тортилой, закрытым пирогом, готовым к употреблению зерновым продуктом, готовым к употреблению сухим пайком, начинкой, пищей для приготовления в микроволновой печи, шоколадным пирожным, пирожным, чизкейком, булочкой к кофе, печеньем, десертом, кондитерским изделием, сдобной булочкой, шоколадным батончиком, коржом пирога, начинкой пирога, детским питанием, смесь для выпечки, блинным тестом, панировкой, смесью для подливы, модификатором мяса, заменителем мяса, смесью специй, суповой смесью, подливой, ру, заправкой для салата, супом, сметаной, лапшой, вермишелью, лапшой рамен, лапшой чоу-мейн, лапшой ло-мейн, наполнителем мороженого, брикетом мороженого, рожком мороженого, сэндвичем мороженого, крекером, крутоном, пончиком, яичным рулетом, формованной закуской, фруктово-зерновым батончиком, закусочным продуктом для приготовления в микроволновой печи, питательным батончиком, блином, заготовкой хлебобулочного изделия, кренделем, пудингом, продуктом на основе гранолы, закусочным чипсом, закусочным продуктом, смесью для закуски, вафлей, основой для пиццы, кормом для животных или кормом для домашних животных.

В альтернативных вариантах реализации изобретения цельнозерновая мука или крупная фракция может быть компонентом пищевой добавки. К примеру, пищевая добавка может быть продуктом, который добавляется к диете, содержащей один или более ингредиентов, как правило включающим: витамины, минеральные вещества, растительные добавки, аминокислоты, ферменты, антиоксиданты, растительные добавки, специи, пробиотики, экстракты, пребиотики и волокна. Цельнозерновая мука или крупная фракция по данному изобретению включает витамины, минеральные вещества, аминокислоты, ферменты и волокна. К примеру, крупная фракция содержит концентрированное количество диетических волокон, а также другие незаменимые питательные вещества, такие как В-витамины, селен, хром, марганец, магний и антиоксиданты, которые незаменимы для здорового питания. К примеру, 22 г крупной фракции по данному изобретению обеспечивает получение 33% рекомендованного индивидуального суточного потребления волокон. Дополнительно, 14 г дает все необходимое для обеспечения получения 20% рекомендованного индивидуального суточного потребления волокон. Таким образом, крупная фракция представляет собой превосходный дополнительный источник для индивидуального потребления волокон. Следовательно, в данном варианте реализации изобретения цельнозерновая мука или крупная фракция может быть компонентом пищевой добавки. Пищевая добавка может включать любые известные питательные ингредиенты, которые будут улучшать общее самочувствие индивида, примеры включают (но не ограничиваются) витамины, минеральные вещества, другие компоненты-волокна, жирные кислоты, антиоксиданты, аминокислоты, пептиды, белки, лютеин, рибоза, омега-3 жирные кислоты и/или другие питательные ингредиенты.

В дополнительных вариантах реализации изобретения цельнозерновая мука или крупная фракция может быть пищевой добавкой волокон или их компонентом. Много современных добавок волокон, таких как шелуха подорожника, производные целлюлозы и гидролизованная гуаровая камедь, имеют ограниченную ценность, не считая их содержания волокон. В дополнение к этому, многие пищевые добавки волокон имеют неприемлемую текстуру и неприятный вкус. Пищевые добавки волокон, приготовленные из цельнозерновой муки или крупной фракции, могут способствовать снабжению волокнами, а также белками и антиоксидантами. Пищевая добавка волокон может поставляться, но не ограничиваться следующими формами: смесями растворимых напитков, готовыми к употреблению напитками, питательными батончиками, вафлями, печеньем, крекерами, гелевыми коктейлями, капсулами, жвачками, жевательными таблетками и пилюлями. В одном варианте реализации изобретения предлагается пищевая добавка волокон в форме ароматизированного коктейля или напитка солодового типа, этот вариант реализации изобретения может быть особенно привлекательным в качестве пищевой добавки волокон для детей.

В дополнительном варианте реализации изобретения процесс измельчения может использоваться для получения многозерновой муки, муки из нескольких сортов ячменя или многозерновой крупной фракции. К примеру, отруби и зародыши из одного типа ячменя могут перемалываться и смешиваться с перемолотым эндоспермом или цельнозерновой ячменной мукой ячменя другого типа. В альтернативном варианте отруби и зародыши из одного типа ячменя могут перемалываться и смешиваться с перемолотым эндоспермом или цельнозерновой мукой зерна другого типа. В дополнительном варианте реализации изобретения отруби и зародыши из первого типа ячменя или зерна могут смешиваться с отрубями и зародышами из второго типа ячменя или зерна для получения многозерновой крупной фракции. Подразумевается, что данное изобретение охватывает смешивание любой комбинации одного или более типов отрубей, зародышей, эндосперма и цельнозерновой муки одного или более типов зерна. Этот подход с использованием нескольких видов зерна, нескольких видов ячменя может применяться для получения оригинальной муки и улучшения качественных свойств и питательного содержания, применяя множество видов зерна или ячменя для получения одной муки.

Цельнозерновая мука по данному изобретению может производиться с помощью разнообразных

процессов измельчения. В типовом варианте реализации изобретения задействуется перемалывание зерна в одном потоке без разделения эндосперма, отрубей и зародышей зерна на отдельные потоки. Очищенное и кондиционированное зерно подается на измельчитель первого прохода, такой как молотковая мельница, роллерная мельница, штифтовая мельница, ударная мельница, дисковая мельница, воздушно-фрикционная мельница, вальцовая мельница и тому подобное. В одном варианте реализации изобретения измельчитель может быть вальцовой мельницей. После перемалывания зерно выгружается и подается на просеиватель. Может использоваться любой известный в данной области техники просеиватель для просеивания перемолотых частиц. Вещество, проходящее через сито просеивателя, представляет собой цельнозерновую муку по данному изобретению и не требует дальнейшей переработки. Вещество, которое остается на сите, называется второй фракцией. Вторая фракция требует дополнительного уменьшения размера частиц. Поэтому вторая фракция может подаваться на измельчитель второго прохода. После измельчения вторая фракция может подаваться на второй просеиватель. Вещество, проходящее через сито второго просеивателя, представляет собой цельнозерновую муку по данному изобретению. Вещество, которое остается на сите, называется четвертой фракцией и требует дальнейшей переработки для уменьшения размера частиц. Четвертую фракцию на сите второго просеивателя подают обратно или на измельчитель первого прохода, или измельчитель второго прохода для дальнейшей переработки через петлю обратной подачи. В альтернативном варианте реализации изобретения процесс может включать множество измельчителей первого прохода для обеспечения большей пропускной способности системы.

Подразумевается, что цельнозерновая мука, крупная фракция и/или зернопродукты по данному изобретению могут производиться любым процессом перемалывания, известным в данной области техники. Дополнительно подразумевается, что цельнозерновая мука, крупная фракция и/или зернопродукты по данному изобретению могут модифицироваться или улучшаться путем многочисленных других процессов, таких как ферментация, инстанизация, экструзия, инкапсулирование, поджаривание, обжаривание или тому подобное.

Полинуклеотиды, которые подавляют продукцию хордеина

В одном варианте реализации изобретения зерно по данному изобретению и/или используемое в способах по данному изобретению получают из трансгенного растения ячменя, которое содержит трансген, что кодирует полинуклеотид, который подавляет в зерне продукцию по меньшей мере одного хордеина. Примеры таких полинуклеотидов включают, но не ограничиваются, антисмысловым полинуклеотидом, смысловым полинуклеотидом, каталитическим полинуклеотидом, искусственной микроРНК или дуплексной молекулой РНК. Каждый из этих полинуклеотидов, когда он присутствует в зерне, приводит к уменьшению доступной для трансляции мРНК хордеина.

Антисмысловые полинуклеотиды

Термин "антисмысловой полинуклеотид" должен применяться в значении ДНК, или РНК, или их комбинации, молекулы, которая является комплементарной по меньшей мере к части специфической молекулы мРНК, кодирующей хордеин и способной воздействовать на посттранскрипционное событие, такое как трансляция мРНК. Применение способов с антисмысловыми молекулами хорошо известно в данной области техники (см. к примеру книгу G. Hartmann и S. Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer (1999)). Применение методик с антисмысловыми молекулами собрано в обзорах Bourque (1995) и Senior (1998). Автором Senior (1998) указано, что способы с антисмысловыми молекулами в настоящее время являются надежно отработанной методикой для манипулирования генной экспрессией.

Антисмысловой полинуклеотид в растении ячменя по данному изобретению будет гибридизировать с целевым полинуклеотидом в физиологических условиях. Как используется в данном документе, термин "антисмысловой полинуклеотид, который гибридизуется в физиологических условиях" означает, что полинуклеотид (который является полностью или частично одноцепочечным) является, по меньшей мере, способным образовать двухцепочечный полинуклеотид с мРНК, кодирующей белок, такой как хордеин ячменя, в клетке ячменя в нормальных условиях.

Антисмысловые молекулы могут включать последовательности, которые соответствуют структурным генам или последовательностям, которые осуществляют контроль над генной экспрессией или событием сплайсинга. К примеру, антисмысловая последовательность может соответствовать таргетируемому кодирующему участку генов по данному изобретению, или 5'-нетранслируемому участку (UTR), или 3'-UTR, или комбинациям этих элементов. Она может быть комплементарной, в частности, к интронным последовательностям, которые могут удаляться сплайсингом во время или после транскрипции, предпочтительно только к экзонным последовательностям целевого гена. Принимая во внимание общую большую дивергенцию UTR, таргетирование этих участков обеспечивает большую специфичность ингибирования гена.

Длина антисмысловой последовательности должна быть равна по меньшей мере 19 последовательным нуклеотидам, предпочтительно по меньшей мере 50 нуклеотидам и предпочтительнее по меньшей мере 100, 200, 500 или 1000 нуклеотидам. Может использоваться полноразмерная последовательность, комплементарная целому генному транскрипту. Самой предпочтительной является длина 100-2000 нуклеотидов. Степень идентичности антисмысловой последовательности таргетируемого транскрипта должна быть по меньшей мере 90% и предпочтительнее 95-100%. Антисмысловая молекула РНК конеч-

но может содержать неродственные последовательности, которые могут функционировать с целью стабилизации молекулы.

Каталитические полинуклеотиды

Термин каталитический полинуклеотид/нуклеиновая кислота относится к молекуле ДНК, или ДНК-содержащей молекуле (также известной в данной области техники как "дезоксирибозим"), или РНК, или РНК-содержащей молекуле (также известной как "рибозим"), которая специфически распознает отдельный субстрат и катализирует химическую модификацию этого субстрата. Основания нуклеиновых кислот в каталитической нуклеиновой кислоте могут быть основаниями А, С, G, Т (и U для РНК).

Как правило, каталитическая нуклеиновая кислота содержит антисмысловую последовательность для специфического распознавания целевой нуклеиновой кислоты и нуклеиновую кислоту с расщепляющей ферментной активностью (также называемую в данном документе как "каталитический домен"). Типы рибозимов, которые особенно применимы в этом изобретении, представляют собой рибозим типа головки молотка (Haseloff и Gerlach, 1988, Pettiman et al., 1992) и рибозим типа шпильки (Shippy et al., 1999).

Рибозимы растений ячменя по данному изобретению и кодирующие ДНК рибозимы могут быть химически синтезированы с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Рибозимы также могут быть получены из молекулы ДНК (которая при транскрипции дает молекулу РНК), функционально связанной с промотором РНК-полимеразы, например промотором РНК-полимеразы T7 или РНК-полимеразы SP6. Когда вектор также содержит промотор РНК-полимеразы функционально связанной с молекулой ДНК, то рибозим может продуцироваться *in vitro* при инкубации с РНК-полимеразой и нуклеотидами. В отдельном варианте реализации изобретения ДНК может быть вставлена в экспрессионную кассету или транскрипционную кассету. После синтеза молекула РНК может модифицироваться лигированием с молекулой ДНК, имеющей способность стабилизировать рибозим и делать его устойчивым к РНКазе.

Как и с антисмысловыми полинуклеотидами, описанными в данном документе, каталитические полинуклеотиды также должны быть способны к гибридизации с молекулой целевой нуклеиновой кислоты (к примеру, мРНК, кодирующей хордеин ячменя) в "физиологических условиях", а именно тех условиях, которые присущи клетке ячменя.

РНК-интерференция

РНК-интерференция (RNAi) является особенно подходящим способом для специфического ингибирования продукции конкретного белка. Хотя авторы не желают быть ограниченными конкретной теорией, в статье Waterhouse et al. (1998) представлена модель механизма, с помощью которого дцРНК (дуплексная РНК) может использоваться для уменьшения продукции белка. Эта технология основана на присутствии молекул дцРНК, которые содержат последовательность, что является преимущественно идентичной мРНК представляющего интерес гена или его части, в данном случае мРНК, кодирующей полипептид в соответствии с данным изобретением. В целях удобства дцРНК может продуцироваться из единственного промотора в рекомбинантном векторе или клетке-хозяине, в котором смысловая и антисмысловая последовательности фланкированы неродственными последовательностями, которые дают возможность смысловой и антисмысловой последовательностям гибридизоваться с образованием молекулы дцРНК, образующей с неродственной последовательностью петлевую структуру. Схема и продукция подходящих молекул дцРНК для данного изобретения согласуется с возможностью специалиста в данной области, особенно принимая во внимание публикации Waterhouse et al. (1998), Smith et al. (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029 и WO 01/34815.

В одном примере ДНК внедряется таким образом, что она направляет синтез, по меньшей мере частично, двухцепочечного (дуплексного) продукта(ов) РНК с гомологией к целевому гену, который требуется инактивировать. Следовательно, ДНК содержит как смысловую, так и антисмысловую последовательности, которые при транскрибировании в РНК могут гибридизоваться с образованием двухцепочечного участка РНК. В предпочтительном варианте реализации изобретения смысловая и антисмысловая последовательности разделены спейсерным участком, который содержит интрон, который при транскрибировании в РНК удаляется сплайсингом. Показано, что эта комбинация приводит к большей эффективности генного сайленсинга. Двухцепочечный участок может содержать одну или две молекулы РНК, транскрибируемые или с одного участка ДНК, или с двух. Полагают, что присутствие двухцепочечной молекулы запускает ответ от эндогенной системы растения, который разрушает и двухцепочечную РНК, а также гомологичный РНК-транскрипт из целевого гена растения, эффективно уменьшая или устраняя активность целевого гена.

Длина смысловой и антисмысловой последовательностей, которые гибридизируются, должна быть равна каждая по меньшей мере 19 последовательным нуклеотидам, предпочтительно по меньшей мере 30 или 50 нуклеотидам и предпочтительнее по меньшей мере 100, 200, 500 или 1000 нуклеотидам. Может использоваться полноразмерная последовательность, соответствующая целому геному транскрипту. Самыми предпочтительными являются длины 100-2000 нуклеотидов. Степень идентичности смысловой и антисмысловой последовательностей таргетируемого транскрипта должна быть по меньшей мере 85%, предпочтительно 90% и предпочтительнее 95-100%. Молекула РНК конечно может содержать неродствен-

ные последовательности, которые могут функционировать с целью стабилизации молекулы. Молекула РНК может экспрессироваться под контролем промотора РНК-полимеразы II или РНК-полимеразы III. Примеры последних включают промотор тРНК или мРНК.

Предпочтительные молекулы малых интерферирующих РНК ("миРНК") содержат нуклеотидную последовательность, которая идентична около 19-21 последовательным нуклеотидам в целевой мРНК. Предпочтительно последовательность целевой мРНК начинается с динуклеотида АА, включает GC-содержание около 30-70% (предпочтительно, 30-60%, предпочтительнее 40-60% и предпочтительнее около 45-55%) и не обладает высоким процентом идентичности к любой нуклеотидной последовательности, отличающейся от целевой, в геноме растения ячменя, в который она внедряется, например, как определяется стандартным поиском в программе BLAST.

МикроРНК

Регуляция с помощью микроРНК несомненно является специализированным ответвлением механизма сайленсинга РНК, который вовлечен в генную регуляцию, отходя от традиционного механизма RNAi/PTGS. МикроРНК представляют собой специфический класс малых РНК, которые закодированы в геноподобных элементах, организованных в характерные инвертированные повторы. При транскрипции гены микроРНК обеспечивают возрастание количества стеблево-петлевых предшественников РНК, из которых впоследствии процессируются микроРНК. МикроРНК, как правило, состоят в длину из около 21 нуклеотида. Высвобожденные микроРНК инкорпорируются в RISC-подобные комплексы, содержащие конкретный поднабор белков-аргонавтов, которые вызывают репрессию последовательность-специфических генов (см., к примеру, статьи Millar и Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida и Allshire, 2005).

Косуппрессия

Другим молекулярно-биологическим подходом, который может использоваться, является косуппрессия. Механизм косуппрессии не является четко понятным, но предполагается, что он вовлечен в посттранскрипционный сайленсинг генов (PTGS) и в этом отношении может быть очень сходен с многими примерами антисмысловой суппрессии. В нем вовлечено внедрение дополнительной копии гена или его фрагмента в растение, в смысловой ориентации в отношении промотора, для его экспрессии. Размер смыслового фрагмента, его соответствие целевым генным участкам и степень его идентичности последовательности с целевым геном являются такими, как для антисмысловых последовательностей, описанных выше. В некоторых случаях дополнительная копия генной последовательности влияет на экспрессию целевого гена растения. Для способов осуществления подходов косуппрессии приводятся ссылки на публикации WO 97/20936 и EP 0465572.

Конструкции нуклеиновых кислот

Конструкции нуклеиновых кислот, пригодные для получения трансгенных растений, могут легко создаваться с использованием стандартных методик.

При inserции участка, кодирующего мРНК, конструкция может содержать интронные последовательности. Эти интронные последовательности могут способствовать экспрессии трансгена в растениях. Термин "интрон" используется в своем обычном смысле в значении генетического сегмента, который транскрибируется, но не кодирует белок, и который удаляется сплайсингом из РНК перед трансляцией. Интроны могут внедряться в 5'-UTR или кодирующий участок, если трансген кодирует транслируемый продукт, или в любое место транскрибируемого участка, если не кодирует. Однако в предпочтительном варианте реализации изобретения любой кодирующий полипептид участок представлен как единственная открытая рамка считывания. Специалист, получающий задание, должен понимать, что такие открытые рамки считывания могут быть получены обратным транскрибированием мРНК, кодирующей полипептид.

Для обеспечения соответствующей экспрессии гена, кодирующего представляющую интерес мРНК, конструкция нуклеиновой кислоты, как правило, содержит один или более регуляторных элементов, таких как промоторы, энхансеры, а также последовательности терминации транскрипции и последовательности полиаденилирования. Такие элементы хорошо известны в данной области техники.

Участок транскрипционной инициации, содержащий регуляторный(ые) элемент(ы), может обеспечивать в растении регулируемую или конститутивную экспрессию. Предпочтительно экспрессия, по меньшей мере, происходит в клетках семени.

Описан набор конститутивных промоторов, которые активны в растительных клетках. Подходящие промоторы для конститутивной экспрессии в растениях включают (но не ограничиваются) промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), 35S вируса мозаики норичника (FMV), промотор бациллообразного вируса сахарного тростника, промотор вируса желтой крапчатости коммелины, индуцируемый светом промотор из малой субъединицы рибулозо-1,5-бис-фосфаткарбоксилазы, промотор цитозольной триозофосфатизомеразы риса, промотор аденинфосфорибозилтрансферазы Arabidopsis, промотор гена актина 1 риса, промотор маннопинсинтазы и октопинсинтазы, промотор Adh, промотор сахарозсинтазы, промотором R-генного комплекса и промотор гена хлорофилл- α/β -связывающего белка. Эти промоторы применяют для создания ДНК-векторов, которые экспрессируются в растениях; см., например, публикацию WO 84/02913. Все эти промоторы применяют для создания различных типов экспрессируемых в

растениях рекомбинантных ДНК-векторов.

Промотор может модулироваться такими факторами как температура, свет или стрессовое воздействие. Обычно регуляторные элементы будут находиться на 5'-конце генетической последовательности, которую требуется экспрессировать. Конструкция также может содержать другие элементы, которые усиливают транскрипцию, такие как участки полиаденилирования *pos* 3' или *ocs* 3' или терминаторы транскрипции.

5'-нетранслируемая лидерная последовательность может быть получена из промотора, выбранного для экспрессии гетерологичной генной последовательности и, если требуется, может быть специфически модифицированной для увеличения трансляции мРНК. Для получения обзора оптимизации экспрессии трансгенов см. статью Koziel et al. (1996). 5'-нетранслируемые участки также могут быть получены из вирусных РНК растений (среди прочих вируса табачной мозаики, вируса гравировки табака, вируса карликовой мозаики кукурузы, вируса мозаики люцерны) из подходящих эукариотических генов, генов растений (лидера гена хлорофилл-*a/b*-связывающего белка пшеницы и кукурузы) или из синтетической генной последовательности. Данной изобретение не ограничено применением конструкций, в которых нетранслируемый участок получен из 5'-нетранслируемой последовательности, которая сопровождает промоторную последовательность. Лидерная последовательность также может быть получена из неродственного промотора или кодирующей последовательности. Лидерные последовательности, пригодные в контексте данного изобретения, включают лидер кукурузы Hsp70 (US 5362865 и US 5859347) и элемент омега ВТМ.

Терминация транскрипции выполняется 3'-нетранслируемой последовательностью ДНК, функционально связанной в химерном векторе с представляющим интерес полинуклеотидом. 3'-нетранслируемый участок рекомбинантной молекулы ДНК содержит сигнал полиаденилирования, который функционирует в растениях, обуславливая добавление аденилатных нуклеотидов к 3'-концу РНК. 3'-нетранслируемый участок может быть получен из различных генов, которые экспрессируются в клетках растений. В этой связи обычно используют 3'-нетранслируемый участок нопалинсинтазы, 3'-нетранслируемый участок из малой субъединицы гена рибулозобисфосфаткарбоксилазы гороха, 3'-нетранслируемый участок из гена 7S запасного белка семян сои. Пригодны также 3'-транскрибируемые нетранслируемые участки, содержащие сигнал полиаденилирования плазмидных генов *Agrobacterium*, индуцирующих опухоли (Ti).

Как правило, конструкция нуклеиновой кислоты содержит селективируемый маркер. Селективируемые маркеры помогают при идентификации и скрининге растений или клеток, которые трансформировали молекулой экзогенной нуклеиновой кислоты. Селективируемый маркерный ген может обеспечивать устойчивость к антибиотикам или гербицидам клеток ячменя или позволяет усваивать субстраты, такие как маннозу. Селективируемый маркер предпочтительно придает клеткам ячменя устойчивость к гигромицину.

Предпочтительно конструкция нуклеиновой кислоты стабильно инкорпорируется в геном растения. Соответственно нуклеиновая кислота содержит подходящие элементы, которые позволяют молекуле инкорпорироваться в геном, или конструкция помещается в подходящий вектор, который может быть инкорпорирован в хромосому клетки растения.

Один вариант реализации по данному изобретению включает применение рекомбинантного вектора, который включает по меньшей мере трансген, отмеченный в данном документе, вставленный в любой вектор, способный доставлять молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Такой вектор содержит гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, которые представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые в природе не находятся по соседству с молекулами нуклеиновых кислот по данному изобретению и которые предпочтительно получены из видов, отличающихся от видов, из которых получена(ы) молекула(ы) нуклеиновых кислот. Вектор может быть РНК или ДНК, прокариотической или эукариотической и, как правило, является вирусной или плазмидной.

Набор векторов, подходящих для стабильной трансфекции растительных клеток или для разработки трансгенных растений, описан, например, в публикациях Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989 и Gelvin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Как правило, экспрессионные векторы для растений включают, к примеру, один или более клонируемых генов растений под транскрипционным контролем из 5'- и 3'-регуляторных последовательностей и доминантный селективируемый маркер. Такие экспрессионные векторы для растений также могут содержать промоторный регуляторный участок (например, регуляторный участок, контролируемый индуцибельно или конститутивно, регулируемый окружающими условиями или стадиями развития, или клеточно- или тканеспецифический для экспрессии), стартовый сайт инициации транскрипции, связывающий рибосомы сайт, сигнал процессинга РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Трансгенные растения

Трансгенные растения ячменя, как определены в контексте данного изобретения, включают растения (а также части и клетки указанных растений) и их потомство, которое генетически модифицировано с использованием рекомбинантных методов, что обуславливает продукцию по меньшей мере одного полинуклеотида и/или полипептида в требуемом растении или органе растения. Трансгенные растения мо-

гут быть получены с использованием методик, известных в данной области техники, таких как те, которые в общем описаны в публикациях A. Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003) и P. Christou и H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

В предпочтительном варианте реализации изобретения трансгенные растения гомологичны по каждому отдельному гену, который был внедрен (трансген) потомству, не сегрегируют по требуемому фенотипу. Трансгенные растения также могут быть гетерозиготными по внедренному(ым) трансгену(ам), такими как, к примеру, в потомстве F₁, которое выращивается из гибридного растения. Такие растения могут предоставлять преимущества, такие как гибридную жизнеспособность, хорошо известные в данной области техники.

Описано четверо общих типов способов для прямой доставки гена в клетки: (1) химические способы (Graham et al., 1973); (2) физические способы, такие как применение микроинъекции (Carpeschi, 1980); электропорации (см., к примеру, WO 87/06614, US 5472869, 5384253, WO 92/09696 и WO 93/21335) и генной пушки (см., к примеру, US 4945050 и US 5141131); (3) использование вирусных векторов (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis et al., 1988) и (4) применение рецепторопосредованных механизмов (Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992).

Способы с использованием ускорения, которые могут использоваться, включают, к примеру, бомбардировку микрочастицами и тому подобные способы. Одним примером способа для доставки молекул, трансформирующих нуклеиновые кислоты в растительные клетки, является бомбардировка микрочастицами. Этот способ рассмотрен в статье Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небиологические частицы (микроснаряды), которые могут покрываться нуклеиновыми кислотами и доставляться в клетки реактивной силой. Типичные частицы включают частицы, содержащие вольфрам, золото, платину и тому подобные вещества. Особое преимущество бомбардировки микрочастицами, в дополнение к тому, что она является эффективным способом воспроизводимой трансформации однодольных, заключается в том, что не требуется ни выделение протопластов, ни восприимчивость к инфекции *Agrobacterium*. Иллюстративным вариантом реализации способа доставки ДНК в клетки *Zea mays* путем ускорения является биолистическая система доставки α -частиц, которая может использоваться для проталкивания частиц, покрытых ДНК, через сито, такое как сито из нержавеющей стали или материала Nytex, на поверхности фильтра, покрытого клетками кукурузы, культивируемыми в суспензии. Система доставки частиц, подходящая для применения в данном изобретении, представляет собой пушку для ускорения гелием PDS-1000/He, поставляемую компанией Bio-Rad Laboratories.

Для бомбардировки клетки в суспензии могут быть сконцентрированы на фильтрах. Фильтры, содержащие клетки, требующие бомбардировки, располагают на подходящем расстоянии ниже пластины, останавливающей микроснаряды. Если требуется, одно или более сит также располагается между пушкой и клетками, требующими бомбардировки.

В альтернативном варианте незрелые эмбрионы или другие клетки-мишени могут распределяться на плотной среде для культивирования. Клетки, требующие бомбардировки, располагают на подходящем расстоянии ниже пластины, останавливающей микроснаряды. Если требуется, одно или более сит также располагается между устройством ускорения и клетками, требующими бомбардировки. Благодаря тому, что применение методик изложено в данном документе, кто-то может получить вплоть до 1000 или более фокусов клеток, транзистентно экспрессирующих маркерный ген. Количество клеток в фокусе, которые экспрессируют экзогенный генный продукт через 48 ч после бомбардировки, часто находится в диапазоне от 1 до 10 и в среднем составляет от 1 до 3.

При трансформации путем бомбардировки кто-то может оптимизировать предваряющие бомбардировку условия культивирования и параметры бомбардировки для выхода максимальных количеств стабильных трансформантов. В этой технологии важными являются как физические, так и биологические параметры бомбардировки. Физические факторы - те, которые сопровождают манипулирование осаждением ДНК/микроснарядах, или те, которые влияют на полет и скорость как макро-, так и микроснарядов. Биологические факторы включают все этапы, задействованные при манипулировании клетками перед и непосредственно после бомбардировки, осмотической коррекции клеток-мишеней для помощи в смягчении травмы, связанной с бомбардировкой, а также природу трансформирующей ДНК, такой как линейаризованная ДНК или интактные суперспирализованные плазмиды. Считается, что предваряющие бомбардировку манипуляции особенно важны для успешной трансформации незрелых эмбрионов.

В другом альтернативном варианте реализации изобретения могут быть стабильно трансформированы пластиды. Способ, описывающий трансформацию пластид высших растений, включает доставку ДНК с использованием пушки для частиц, содержащих селектируемый маркер и таргетирующих ДНК в геном пластид посредством гомологичной рекомбинации (патенты US 5451513, US 5545818, US 5877402, US 5932479 и WO 99/05265).

Соответственно подразумевается, что кто-то может захотеть скорректировать различные аспекты параметров бомбардировки в маломасштабных исследованиях для полной оптимизации условий. Прежде всего кто-то может захотеть скорректировать физические параметры, такие как расстояние промежутка,

расстояние полета, расстояние до ткани и давление гелия. Кто-то может также минимизировать факторы, уменьшающие травму путем модификации условий, которые влияют на физиологическое состояние клеток-реципиентов и которые вследствие этого влияют на эффективность трансформации и интеграции. К примеру, осмотическое состояние, гидратация тканей и стадия субкультивирования или клеточный цикл клеток-реципиентов могут быть скорректированы для оптимальной трансформации. Выполнение других рутинных корректировок станут известны специалистам в данной области техники в свете данного описания.

Опосредованный бактериями *Agrobacterium* перенос является широко применяемой системой для внедрения генов в растительные клетки, потому что ДНК может быть внедрена в целые ткани растений, тем самым минуя потребность в регенерации интактного растения из протопласта. Использование опосредованных *Agrobacterium* интегрирующих векторов растений для внедрения ДНК в растительные клетки хорошо известно в данной области техники (см., к примеру, патенты US 5177010, US 5104310, US 5004863, US 5159135). Дополнительно интеграция Т-ДНК является относительно точным процессом, приводящим к незначительным перестройкам. Участок ДНК, который требуется перенести, определяется граничными последовательностями, а промежуточная ДНК обычно вставляется в геном растения.

Современные трансформационные векторы *Agrobacterium* способны к репликации в *E. coli*, также как в *Agrobacterium*, позволяя выполнять удобные манипуляции, как описано авторами (Klee et al., B: Plant DNA Infectious Agents, Hohn и Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)). Более того, технологический прогресс касательно векторов для опосредованного *Agrobacterium* переноса генов улучшил упорядочивание генов и сайтов рестрикции в векторах для облегчения конструирования векторов, способных экспрессировать различные кодирующие полипептиды гены. Описанные векторы имеют удобные мультилинкерные участки, фланкированные промотором и сайтом полиаденилирования для прямой экспрессии вставляемых генов, кодирующих полипептиды, и являются подходящими для целей данного изобретения. В дополнение к этому, для трансформаций могут применяться *Agrobacterium*, содержащие Тi-гены, как снабженные плечами, так и не снабженные плечами. В таких разновидностях растений, в которых эффективна опосредованная *Agrobacterium* трансформация, это является предпочтительным способом из-за легко поддающейся влиянию и определенной природы переноса генов.

Трансгенное растение, образованное при использовании трансформационных способов с *Agrobacterium*, как правило, содержит единственный генетический локус на одной хромосоме. С такими трансгенными растениями могут поступать как с гемизиготными по добавленному гену. Предпочтительнее использовать трансгенное растение, которое гомозиготно по добавленному структурному гену; т.е. трансгенное растение, которое содержит два добавленных гена, по одному гену в одинаковом локусе на каждой хромосоме хромосомной пары. Гомозиготное трансгенное растение может быть получено путем полового скрещивания (самоопыления) независимого сегрегантного трансгенного растения, которое содержит единственный добавленный ген, проращиванием нескольких семян, полученных и проанализированных результирующих растений на предмет содержания представляющего интерес гена.

Должно также быть понятно, что два различных трансгенных растения также могут скрещиваться для получения потомства, которое содержит два независимо сегрегирующих экзогенных гена. Самоопыление соответствующего потомства может создать растения, которые гомозиготны по обоим экзогенным генам. Подразумевается также обратное скрещивание исходного растения и неродственное скрещивание с нетрансгенным растением, так же, как и вегетативное размножение. Описания других способов разведения, которые обычно используются для получения разных признаков и культур, могут быть найдены у автора Fehr, в: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Трансформация протопластов растений может быть достигнута с использованием способов, основанных на осаждении фосфата кальция, обработки полиэтиленгликолем, электропорации и комбинаций этих обработок. Применение этих систем к разным разновидностям растений зависит от способности регенерировать такой конкретный растительный штамм из протопластов. Описаны иллюстративные способы для регенерации зерновых культур из протопластов (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

Могут также использоваться другие способы трансформации клеток и включать (но не ограничиваться) внедрение ДНК в растения прямым переносом ДНК в пыльцу, прямой инъекцией ДНК в репродуктивные органы растения или прямой инъекцией ДНК в клетки незрелых эмбрионов после регидратации высушенных эмбрионов.

Регенерация, развитие и культивация растений из протопластов-трансформантов единственного растения или из различных трансформированных эксплантатов хорошо известны в данной области техники (Weissbach et al., в: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). Этот процесс регенерации и роста, как правило, включает этапы отбора трансформированных клеток, культивирование этих индивидуализированных клеток посредством обычных стадий эмбрионального развития через стадию укоренения ростков. Трансгенные эмбрионы и семена регенерируют сходным образом. После этого полученные в результате трансгенные укорененные всходы выращивают в подходящей среде для выращивания растений, такой как почва.

Развитие или регенерация растений, содержащих чужеродный экзогенный ген, хорошо известно в данной области техники. Предпочтительно регенерированные растения являются самоопыляющимися, что обеспечивает получение трансгенных растений. В противоположном случае пыльцу из регенерированных растений скрещивают с выращенными из семян растениями агрономически значимых линий. И наоборот, пыльцу из растений этих значимых линий используют для опыления регенерированных растений. Трансгенное растение по данному изобретению, содержащее требуемую экзогенную нуклеиновую кислоту, культивируется с использованием способов, хорошо известных специалисту в данной области техники.

Способы трансформирования двудольных, главным образом с использованием бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, и получение трансгенных растений опубликованы для хлопка (US 5004863, US 5159135, US 5518908); сои (US 5569834, US 5416011); капусты (US 5463174); арахиса (Cheng et al., 1996) и гороха (Grant et al., 1995).

Способы трансформации зерновых растений, таких как ячмень, для внедрения генетической вариации в растение внедрением экзогенной нуклеиновой кислоты и для регенерации растений из протопластов или незрелых эмбрионов растений хорошо известны в данной области техники, см., к примеру, патенты CA 2092588, AU 61781/94, AU 667939, US 6100447, PCT/US97/10621, US 5589617, US 6541257 и WO 99/14314. Предпочтительно трансгенные растения ячменя получают путем опосредованных *Agrobacterium tumefaciens* трансформационных процедур. Векторы, несущие требуемую конструкцию нуклеиновой кислоты, могут внедряться в регенерируемые клетки ячменя, ткани культивируемых растений, или эксплантаты, или в подходящие растительные системы, такие как протопласты.

Регенерируемые клетки ячменя предпочтительно извлекают из щитка незрелых эмбрионов, зрелых эмбрионов, полученного из них каллуса или меристематической ткани.

Для подтверждения наличия трансгенов в трансгенных клетках и растениях может выполняться амплификация полимеразной цепной реакцией (ПЦР) или анализ Саузерн-блоттинга, используя методы, известные специалистам в данной области техники. Продукты экспрессии трансгенов могут детектироваться любым из разнообразных способов, в зависимости от природы продукта, и включают вестерн-блоттинг и ферментный анализ. Один особенно подходящий способ количественного определения экспрессии белков и детекции репликации в различных тканях растений представляет собой использование репортерного гена, такого как GUS. Как только получают трансгенные растения, они могут выращиваться для получения тканей или частей растений, имеющих требуемый фенотип. Могут быть заготовлены ткани растений или части растений и/или собраны семена. Семя может служить источником для выращивания дополнительных растений с тканями или частями, имеющими требуемые свойства.

Получение мутантных растений

Существует много методик, известных в данной области техники, которые могут применяться для получения ячменя с уменьшенным содержанием хордеинов методом мутирования эндогенных генов хордеинов, включающих без ограничения метод TILLING, использование цинк-пальцевой нуклеазы, TAL-эффлекторной нуклеазы (TALEN) и коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR).

TILLING

Растения по данному изобретению могут получать с использованием процесса, известного как TILLING (индуцированные таргетингом локальные поражения в геномах). На первом этапе получают внедренные мутации, такие как индуцированные в популяции растений ранее не существовавшие изменения в одной паре оснований путем обработки семян (или пыльцы) химическим мутагеном, и потом разводят растения до получения генерации, в которой мутации будут стабильно наследоваться. ДНК выделяют и собирают семена от всех представителей популяции для создания источника, к которому можно повторно получать доступ в течение продолжительного времени.

Для анализа TILLING разработаны ПЦР-праймеры для специфической амплификации единственного представляющего интерес гена-мишени. Специфичность особенно важна, если мишень представляет собой представителя семейства генов или часть полиплоидного генома. Далее для амплификации ПЦР-продуктов из объединенной ДНК из множества отдельных растений могут применяться меченые красителем праймеры. Эти ПЦР-продукты денатурируют и вторично отжигают так, чтобы дать возможность образоваться некомплементарным парам оснований. Мисматчи или гетеродуплексы оба представляют как встречающиеся в природе типы однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) (т.е. несколько растений из популяции с вероятностью несут такой полиморфизм), так и индуцированные ОНП (т.е. только редкие отдельные растения с вероятностью проявляют мутацию). После образования гетеродуплекса ключевым моментом для выявления ранее не существовавших ОНП в пределах популяции после применения метода TILLING является использование эндонуклеазы, такой как Cel I, которая распознает и расщепляет некомплементарную ДНК.

С применением этого подхода могут проходить скрининг тысячи растений для идентификации любого отдельного однонуклеотидного изменения, а также малых инсерций и делеций (1-30 п.н.) в любом гене или специфическом участке генома. Анализируемые геномные фрагменты могут находиться в диапазоне любого размера от 0,3 до 1,6 т.н. При 8-кратном объединении определяют фрагменты размером

1,4 т.н. (игнорируя концы фрагментов, где детекция ОНП проблематична из-за шума) и 96 дорожек за один анализ, эта комбинация позволяет проводить скрининг вплоть до миллиона пар оснований геномной ДНК в единственном анализе, что делает TILLING высокопроизводительной методикой.

Метод TILLING дополнительно описан в статьях Slade и Knauf (2005) и Henikoff et al. (2004).

В дополнение к тому, что этот метод позволяет эффективно детектировать мутации, высокопроизводительная технология TILLING является идеальной для детекции природных типов полиморфизма. Следовательно, подробное исследование неизвестной гомологичной ДНК путем образования гетеродуплексов с известной последовательностью выявляет количество и положение полиморфных сайтов. Идентифицируют как нуклеотидные изменения, так и малые инсерции и делеции, включающие, по меньшей мере, некоторое количество повторяющихся типов полиморфизма. Этот процесс был назван Ecotilling (Comai et al., 2004).

Каждый тип ОНП записывается по его приблизительному положению в пределах нескольких нуклеотидов. Таким образом, может быть достигнуто определение каждого гаплотипа на основании его мобильности. Данные по последовательностям могут быть получены с относительно малыми, постепенно возрастающими затратами с использованием аликвот, таких же амплифицированных ДНК, которые используются для анализа с мисматч-расщеплением. Левый или правый праймер для секвенирования для единственной реакции выбирают по его приближенности к полиморфизму. Программное обеспечение секвенсера выполняет множественное выравнивание и обнаруживает изменение оснований, которое в каждом случае подтверждается полосой в геле.

Метод Ecotilling может выполняться с меньшими затратами, чем полное секвенирование, в настоящее время этот метод используется в большинстве исследований ОНП. Планшеты, содержащие упорядоченные экотипические ДНК, могут проходить скрининг проще, чем объединения ДНК из мутировавших растений. Из-за того, что детекция проводится на гелях с разрешением почти до пары оснований, а фоновые паттерны однородны среди дорожек, могут совпадать полосы, которые имеют идентичный размер, таким образом, обнаружение и генотипирование ОНП проходит за один этап. Следовательно, подробнейшее секвенирование по ОНП является простым и эффективным и достигает фактически большего, чем использование аликвот таких же ПЦР-продуктов, применяемых для скрининга, которые могут быть предметом ДНК-секвенирования.

Редактирование генома с использованием сайт-специфических нуклеаз

При редактировании генома применяются сконструированные нуклеазы, содержащие последовательности доменов, специфических связывающих ДНК, гибридизированные с неспецифическим расщепляющим ДНК модулем. Эти химерные нуклеазы способны создавать эффективные и точные генетические модификации индуцированием направленных разрывов двухцепочечной ДНК, которые стимулируют механизмы клетки по репарации эндогенной клеточной ДНК для репарации индуцированного разрыва. Такие механизмы включают, к примеру, допускающее ошибки нехомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологично направленную репарацию (HDR).

В присутствии плазмиды-донора с дополнительными гомологичными плечами HDR может приводить к внедрению одного или множества трансгенов для коррекции или замены существующих генов. В отсутствие плазмиды-донора NHEJ-опосредованная репарация оставляет малые инсерционные и делеционные мутации мишени, которые вызывают разрушение гена.

Сконструированные нуклеазы, пригодные для способов по данному изобретению, включают цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) и подобные активатору транскрипции (TAL) эффекторные нуклеазы (TALEN).

Как правило, нуклеазы, кодирующие гены, доставляются в клетки плазмидными ДНК, вирусными векторами или транскрибируемыми *in vitro* мРНК. Применение флуоресцентных суррогатных репортерных векторов также позволяет проводить обогащение ZFN- и TALEN-модифицированных клеток. Как альтернатива системам доставки ZFN-генов, клетки могут контактировать с очищенными ZFN-белками, которые способны пересекать клеточные мембраны и индуцировать разрушение эндогенных генов.

Сложные геномы часто содержат множество копий последовательностей, которые идентичны или в высшей степени гомологичны с предполагаемой ДНК-мишенью, что потенциально приводит к нецелевой активности и клеточной токсичности. Для разрешения этого вопроса может применяться структура (Miller et al., 2007; Szczepek et al., 2007) и основанные на отборе подходы (Doyon et al., 2011; Guo et al., 2010) для создания улучшенных гетеродимеров ZFN и TALEN с оптимизированной специфичностью расщепления и уменьшенной токсичностью.

Цинк-пальцевая нуклеаза (ZFN) содержит ДНК-связывающий домен и ДНК-расщепляющий домен, причем ДНК-связывающий домен содержит по меньшей мере один цинковый палец и функционально связан с ДНК-расщепляющим доменом. Цинк-пальцевый ДНК-связывающий домен находится на N-конце белка, а ДНК-расщепляющий домен размещен на C-конце указанного белка.

ZFN должна иметь по меньшей мере один цинковый палец. В предпочтительном варианте реализации изобретения ZFN должна иметь по меньшей мере три цинковых пальца для того, чтобы иметь достаточную специфичность, чтобы быть пригодной для направленной генетической рекомбинации в клетке-хозяине или организме. Как правило, ZFN, имеющая более трех цинковых пальцев, должна иметь про-

порционально большую специфичность с каждым дополнительным цинковым пальцем.

Цинк-пальцевый домен может происходить из любого класса или типа цинкового пальца. В конкретном варианте реализации изобретения цинк-пальцевый домен содержит цинковый палец типа Cis_2His_2 , который широко представлен в большинстве случаев, к примеру в цинк-пальцевых факторах транскрипции TFIIIA или Sp1. В предпочтительном варианте реализации изобретения цинк-пальцевый домен содержит три цинковых пальца типа Cis_2His_2 . Распознавание ДНК и/или специфичность связывания ZFN может быть изменена для того, чтобы выполнить направленную генетическую рекомбинацию в любом выбранном сайте в клеточной ДНК. Такие модификации могут выполняться с использованием известных молекулярно-биологических и химических методик синтеза (см., к примеру, статью Bibikova et al., 2002).

ДНК-расщепляющий домен ZFN получают из класса неспецифических ДНК-расщепляющих доменов, к примеру ДНК-расщепляющий домен фермента рестрикции II типа, такого как FokI (Kim et al., 1996). Другие подходящие эндонуклеазы могут включать, к примеру, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI и AlwI.

Линкер, если он присутствует между расщепляющим и распознающим доменами ZFN, содержит последовательность аминокислотных остатков, выбранных таким образом, чтобы результирующий линкер был гибким. Или, для максимальной специфичности к целевому сайту, делают безлинкерную конструкцию. Безлинкерная конструкция обладает сильным преимуществом для связывания и последующего расщепления между сайтами распознавания, которые находятся на удалении 6 п.н. Тем не менее, для длин линкеров между 0 и 18 аминокислотами в длину ZFN-опосредованное расщепление происходит между сайтами распознавания, которые находятся на удалении между 5 и 35 п.н. Для данной длины линкеров будет существовать предел расстояния между сайтами распознавания, который согласуется как со связыванием, так и с димеризацией (Bibikova et al., 2001). В предпочтительном варианте реализации изобретения отсутствует линкер между расщепляющим и распознающим доменами, а целевой locus содержит сайты распознавания из двух-девяти нуклеотидов в обращенной ориентации в отношении друг друга, разделенные спейсером из шести нуклеотидов.

Для того, чтобы направить генетическую рекомбинацию или мутацию в соответствии с предпочтительным вариантом реализации по данному изобретению, в хозяйской ДНК должны быть идентифицированы две ДНК-распознающие последовательности с цинковым пальцем из 9 п.н. Эти сайты распознавания должны быть в инвертированной ориентации в отношении друг друга и разделены около 6 п.н. ДНК. Потом создают ZFN разработкой и получением комбинаций цинковых пальцев, которые специфически связывают ДНК в целевом локусе, а потом связывая цинковые пальцы с ДНК-расщепляющим доменом.

Активность ZFN может быть улучшена посредством применения транзистентных гипотермических условий культивирования для увеличения уровней экспрессии нуклеаз (Doyon et al., 2010) и совместной доставкой сайт-специфических нуклеаз с процессирующими по концам ДНК ферментами (Certo et al., 2012). Специфичность ZFN-опосредованного редактирования генома может быть улучшена использованием цинк-пальцевых никаз (ZFN-никаз), которые стимулируют HDR без активации допускающего ошибки механизма репарации NHE-J (Kim et al., 2012; Wang et al., 2012; Ramirez et al., 2012; McConnell Smith et al., 2009).

Подобная активатору транскрипции (TAL) эффекторная нуклеаза (TALEN) содержит TAL-эффекторный ДНК-связывающий домен и эндонуклеазный домен.

TAL-эффекторы представляют собой белки патогенных для растений бактерий, которые инъецируются патогеном в растительную клетку, в которой они перемещаются в ядро и функционируют как факторы транскрипции, активирующие специфические гены растений. Первичная аминокислотная последовательность TAL-эффектора обуславливает нуклеотидную последовательность, с которой она связывается. Таким образом, целевые сайты могут быть предсказаны для TAL-эффекторов, а TAL-эффекторы могут конструироваться и создаваться с целью связывания с конкретными нуклеотидными последовательностями.

Гибридизированные с кодирующими TAL-эффекторы последовательностями нуклеиновых кислот представляют собой последовательности, кодирующие нуклеазу или часть нуклеазы, как правило, неспецифический расщепляющий домен эндонуклеазы рестрикции II типа, такой как FokI (Kim et al., 1996). Другие подходящие эндонуклеазы могут включать, к примеру, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI и AlwI. Тот факт, что некоторые эндонуклеазы (например, FokI) функционируют только в виде димеров, может быть использован для усиления целевой специфичности TAL-эффектора. К примеру, в некоторых случаях каждый мономер FokI может гибридизоваться с TAL-эффекторной последовательностью, которая распознает разные последовательности ДНК-мишеней, и только когда два сайта распознавания находятся в непосредственной близости, приводит неактивные мономеры к объединению для образования функционального фермента. Если требуется связывание ДНК для активации нуклеазы, может быть создан высокоактивный сайт-специфический фермент рестрикции.

Последовательность-специфическая TALEN может распознавать конкретную последовательность в предварительно выбранной целевой нуклеотидной последовательности, присутствующей в клетке. Та-

ким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения целевая нуклеотидная последовательность может сканироваться на наличие сайтов распознавания нуклеаз, и на основании целевой последовательности может выбираться конкретная нуклеаза. В других случаях TALEN может конструироваться для таргетирования конкретной клеточной последовательности.

Редактирование генома с использованием программируемых РНК-направляемых ДНК-эндонуклеаз

Отличающаяся от сайт-специфических нуклеаз, описанных выше, система с использованием коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/Cas, представляет альтернативу ZFN и TALEN в индуцировании направленных генетических изменений. В бактериях система CRISPR обеспечивает приобретенный иммунитет против проникновения чужеродной ДНК посредством РНК-направленного расщепления ДНК.

Системы CRISPR основаны на CRISPR РНК (crRNA) и транскрибирующей РНК (tracrRNA) для последовательность-специфического сайленсинга проникающей чужеродной ДНК. Существует три типа систем CRISPR/Cas: в системах II типа Cas9 служит РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазой, которая расщепляет ДНК при направленном распознавании crRNA-tracrRNA. Основания CRISPR РНК спариваются с tracrRNA с образованием двойной РНК-структуры, которая направляет эндонуклеазу Cas9 к комплементарным сайтам ДНК для расщепления.

Система CRISPR может переноситься в растительные клетки совместной доставкой плазмид, экспрессирующих эндонуклеазу Cas и необходимые компоненты crRNA. Эндонуклеаза Cas может превращаться в нуклеазу для обеспечения дополнительного контроля над механизмом репарации ДНК (Cong et al., 2013).

Локусы CRISPR являются отличающимся классом коротких перемежающихся повторов последовательностей (SSR), которые сначала были распознаны у *E. coli* (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989). Сходные перемежающиеся SSR были идентифицированы в бактериях *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* и *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993; Hoe et al., 1999; Masepohl et al., 1996; Mojica et al., 1995).

Локусы CRISPR отличаются от других SSR структурой повторов, которые были названы короткими регулярно разделенными повторами (SRSR) (Janssen et al., 2002; Mojica et al., 2000). Повторы представляют собой короткие элементы, которые встречаются в кластерах, которые всегда регулярно разделены промежуточными последовательностями постоянной длины (Mojica et al., 2000). Хотя повторяющиеся последовательности являются высококонсервативными среди штаммов, количество перемежающихся повторов и последовательностей спейсерных участков отличается от штамма к штамму (van Embden et al., 2000).

Обычные структурные свойства локусов CRISPR описаны в статье Jansen et al., (2002), такие как (i) присутствие множества коротких прямых повторов, которые не показывают или проявляют очень малую вариацию последовательностей в пределах данного локуса; (ii) присутствие неповторяющихся спейсерных последовательностей между повторами сходного размера; (iii) присутствие обычной лидерной последовательности из нескольких сотен пар оснований в большинстве видов, содержащих множество локусов CRISPR; (iv) отсутствие длинных открытых рамок считывания внутри локуса и (v) присутствие одного или более генов cas.

Как правило, CRISPR представляют собой короткие частично палиндромные последовательности из 24-40 п.н., содержащие внутренние и концевые обращенные повторы размером вплоть до 11 п.н. Хотя были детектированы изолированные элементы, в большинстве случаев они упорядочены в кластеры из вплоть до 20 или более на геном повторяющихся единиц, разделенных уникальными перемежающимися последовательностями из 20-58 п.н. В большинстве случаев CRISPR гомогенны внутри данного генома, большинство из них являются идентичными. Тем не менее, существуют примеры гетерогенности, к примеру, в статье Archaea (Mojica et al., 2000).

Как используется в данном документе, термин "ген cas" относится к одному или более генам cas, которые в большинстве случаев сцеплено ассоциированы, или близко расположены, или находятся по соседству с фланкированными CRISPR локусами. Исчерпывающий обзор семейства белков Cas представлен в статье Haft et al. (2005). Количество генов cas в данном локусе CRISPR среди видов может сильно варьировать.

Примеры

Пример 1. Материалы и методы.

Растительный материал

Линия ячменя сорта Sloop (дикий тип) получена из австралийской коллекции озимых зерновых культур (г. Темворт, Австралия). Линии Risø 56 (не экспрессирующая В-хордеины) и Risø 1508 (не экспрессирующая С-хордеины и экспрессирующая уменьшенное количество D- и В-хордеинов) (Doll, 1973; Doll, 1983) получены из скандинавского банка зародышевой плазмы (г. Алнарп, Швеция). Линия Risø 1508 является индуцированным этиленимином мутантом, несущим мутацию в гене Lys3a на хромосоме 5Н, которая уменьшает накопление С-хордеинов. Каждая из этих линий является общедоступной. Растения выращивали в условиях теплицы при 25°C днем и 20°C ночью, а собранные семена проверяли, чтобы

исключить контаминацию. Для экспериментов по осоложиванию и варке пива растения сортов Sloop, Risø 56 и Risø 1508 выращивали рядом в полевых условиях на опытной станции CSIRO Гининдерра, г. Канберра, и собрали по 10 кг зерна каждого сорта. Зерно осоложивали и варили партии по 20 л пива с использованием стандартных методик.

Экстракция проламинов из муки

Для экстракции проламинов (спирторастворимых белков) перемалывали зерно в цельнозерновую муку с использованием стандартных методик. Проламины из промытой водой цельнозерновой муки (10 г) растворяли в растворе 55% (об./об.) пропан-2-ола (степень чистоты для ВЭЖХ), 2% (мас./об.) дитиотрептола (ДТТ) инкубацией при 65°C в течение 45 мин и осаждали двумя объемами пропан-2-ола при -20°C в течение ночи. Осажденные проламины растворяли в растворе 8 М мочевины, 1% ДТТ, 25 мМ триэтанолламина-HCl (pH 6) и очищали жидкостной экспресс-хроматографией белков (FPLC) на колонке Resource RPC объемом 4 мл (GE Healthcare, г. Сидней, НЮУ, Австралия) элюированием 30 мл линейного градиента (при 2 мл/мин) от 3 до 60% ацетонитрила с 1% (об./об.) трифторуксусной кислотой (ТФУ).

Метод подготовки образцов с использованием фильтрации (FASP)

50 мкл экстракта хordeинов переносили на фильтр PALL Nanoser с номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ) 10 кДа. Добавляли 200 мкл 8 М мочевины (Sigma) в 0,1 М трис/HCl pH 8,5 (раствор UA) и полученную смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин при около 20°C. Фильтрат из пробирки отбрасывали. К фильтрующему элементу дополнительно добавляли 200 мкл раствора UA и повторно центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Добавляли 100 мкл раствора IAA (0,05 М йодацетамида в UA) и образец смешивали при 600 об/мин в термосмесителе, установленном на 20°C, в течение 1 мин, а потом инкубировали без перемешивания в течение 20 мин. К фильтрующему элементу добавляли 100 мкл раствора UA и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Этот этап повторяли дважды. К фильтрующему элементу добавляли 100 мкл 0,05 М NH_4HCO_3 (бикарбонат аммония, раствор ABC) в воде и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Этот этап повторяли дважды. Добавляли 40 мкл раствора ABC с 15 мкл маточного раствора трипсина (1,5 мкг/мкл, Sigma) и каждый образец смешивали при 600 об/мин в термосмесителе в течение 1 мин. Фильтрующие элементы инкубировали во влажной камере при 37°C в течение 4-18 ч для прохождения ферментативного расщепления. Фильтрующие элементы переносили в новый набор пробирок и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Добавляли 40 мкл раствора ABC и фильтрующие элементы центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Этот этап повторяли дважды. Фракцию фильтрата подкисляли добавлением 15 мкл 5% муравьиной кислоты и лиофилизировали. Экстрагированные высушенные пептиды ресуспендировали в 30 мкл 0,5 % муравьиной кислоты для проведения анализа методом MRM.

Получение сусла и пива

Ячмень осоложивали в системе микроосоложивания Джо Уайта в нескольких баках на 800 г сырья. Режим замачивания включал: 8 ч вымачивания, 9 ч выстаивания, 5 ч вымачивания при 17°C (Sloop); 8 ч вымачивания, 10 ч выстаивания, 5 ч вымачивания при 17°C (Risø 56) и 7 ч вымачивания, 8 ч выстаивания, 3 ч вымачивания при 17°C (Risø 1508). Прорастание происходило в течение 94 ч при 16°C для сорта Sloop и 15°C для двух мутантов с делециями хordeинов. Программа сушки проходила в течение 21 ч при температуре между 50-80°C. Высушенный солод затирали, как подробно описано в статье Colgrave et al. (2012). После указанного времени выстаивания для действия амилазы затор переносили в бойлер и кипятили в течение 1 ч для получения сусла. Во время кипячения кипящее сусло делали горьким с помощью шишек хмеля до достижения значений 21-22 IBU. Сусло охлаждали в течение ночи при 20°C, а потом ферментировали с дрожжами Fermentis US-05 при 18-20°C до завершения брожения, около 2 недель. Нефильтрованное пиво переносили в бочонки и перед розливом в бутылки принудительно насыщали углекислотой.

Анализ пива

Выбор 60 коммерческих видов пива произведен так, как перечислено в дополнительной табл. 1 статьи Colgrave et al. (2012). Из двух разных бутылок каждого вида трехкратно отбирали образцы (1 мл) и проводили дегазацию под пониженным давлением для удаления CO_2 . Отбирали аликвоты (100 мкл) дегазированного пива и восстанавливали их добавлением 20 мкл 50 мМ ДТТ под N_2 в течение 30 мин при 60°C. К этим растворам добавляли 20 мкл 100 мМ йодацетамида (IAM) и образцы инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. К каждому раствору добавляли 5 мкл 1 мг/мл трипсина (Sigma) или химотрипсина (Sigma) и образцы инкубировали при 37°C в течение ночи. Расщепленный пептидный раствор подкисляли добавлением 10 мкл 5% муравьиной кислоты и пропускали через фильтр с отсечением по ММ 10 кДа (Pall, Австралия). Фильтрат лиофилизировали, растворяли в 1% муравьиной кислоте и хранили при 4°C до проведения анализа.

Анализ нерасщепленного сусла и пива

Сусло и пиво (0,1 мл), полученные из ячменя дикого типа (Sloop) и мутантов с делециями хordeинов, пропускали через фильтр с отсечением по молекулярной массе 10 кДа (Pall) центрифугированием при 14000 об/мин в течение 30 мин для получения пептидной фракции, пригодной для анализа ЖХ-МС/МС. Пептидную фракцию (10 мкл) анализировали на масс-спектрометре QStar Elite.

МС с Q-TQF

Образцы хроматографически разделяли на системе для нано-ВЭЖХ Shimadzu (Shimadzu Scientific, г.Райдалмир, Австралия), используя колонку Vydac MS C18 300 Å (150 мм×0,3 мм) с размером частиц 5 мкм (Grace Davison, г. Дирфильд, США) с использованием линейного градиента 2-42% растворителя В в течение 20 мин при скорости потока 3 мкл/мл. Подвижные фазы состояли из растворителя А (0,1% муравьиной кислоты) и растворителя В (0,1% муравьиной кислоты/90% ацетонитрила/10% воды). Масс-спектрометр с квадрупольным времяпролетным детектором для количественного анализа QqTOF QStar Elite использовали в стандартном МС/МС информационно-зависимом режиме сбора данных с нано-электрораспыляющим источником ионизации. Обзорные МС-спектры собирали (m/z 400-1800) в течение 1 с последующими тремя МС/МС-измерениями родоначальных ионов с наибольшей интенсивностью (10 импульсов/второе пороговое значение, заряженное состояние от 2+ до 5+ и диапазоном масс для МС/МС m/z 100-1600) с использованием программы производителя "Smart Exit". Раннее попавшие родоначальные ионы исключали из повторяющихся циклов сбора данных МС/МС в течение 30 с (допустимое отклонение по массе 100 мДа).

МС с линейной ионной ловушкой (тройной квадруполь)

Восстановленные и алкилированные триптические пептиды анализировали на масс-спектрометре с QTRAP Applied Biosystems 4000 (Applied Biosystems, г. Фремингхем, Массачусетс, США), оборудованным источником ионизации TurboV, функционировавшем в режиме генерации положительных ионов. Образцы хроматографически разделяли на СВЭЖХ Shimadzu Nexera (Shimadzu) с использованием колонки Phenomenex Kinetex C18 (2,1 мм×10 см) с линейным градиентом из 5-45% ацетонитрила (ACN) в течение 15 мин со скоростью потока 400 мкл/мин. Элюент из ВЭЖХ непосредственно подавали на масс-спектрометр. Данные получали и обрабатывали с использованием Analyst 1.5 software™. Анализы с информационно-зависимым сбором данных (IDA) проводили с улучшенным МС-сканированием (EMS) по диапазону масс 350-1500 как обзорным сканированием, так и с активизацией при сборе tandemных масс-спектров. Отбирали два самых интенсивных иона с заряженным состоянием 2-5, которое превысило определенное пороговое значение (100000 импульсов), и сначала подвергали их сканированию с улучшенным разрешением (ER) перед сбором данных улучшенного сканирования продуктов (EPI) в диапазоне масс 125-1600.

Анализ масс-спектров и поиск в базах данных

Для идентификации белков использовали программное обеспечение ProteinPilot™ 4.0 (Applied Biosystems) с алгоритмом Paragon. Данные tandemной масс-спектрометрии изучали по сравнению с данными триптического или химотриптического расщеплений *in silico* белков Triticeae из баз данных Uniprot (версия 2011/05) и NCBI (версия 2011/05). Все параметры поиска определяли как модификацию йодацетамидом с алкилированием цистеинов с использованием в качестве фермента расщепления трипсина или химотрипсина. Модификации устанавливали как наборы модификаций "проработка дженерика" или "биологический препарат", представленные с этим программным пакетом, которые содержали 126 возможных модификаций, к примеру ацетилирование, метилирование и фосфорилирование. Набор модификаций для проработки дженерика содержит 51 потенциальную модификацию, которые могут происходить в результате подготовки образцов, к примеру окисление, дегидратация и дезамидирование. Пептиды с одним пропущенным расщеплением были включены в анализ.

Создание и применение специально разработанной базы данных для зерновых культур

Специальную базу данных без резервирования запасных белков семян зерновых культур создавали включением всех опубликованных белковых последовательностей из нуклеотидных элементов в NCBI, индексов генов TIGR или наборов транскриптов растений TIGR, принадлежащих видам Triticum, Hordeum, Avena, Secale и Triticosecale. Нуклеотидные последовательности для вышеуказанных видов транслировали в шести рамках, обрезанных так, чтобы содержать только самую длинную рамку считывания. Набор результирующих белковых последовательностей потом делали нерезервированным. Только последовательности со 100% соответствием от начала до конца соединяли вместе для сохранения всех вариаций. Наконец, эти файлы фильтровали так, чтобы сохранить только элементы, содержащие слова "глютен", "глиадин", "глютенин", "хордеин", "авенин" или "секалин". Проводили поиск данных tandemной масс-спектрометрии по сравнению со специальной базой данных зерновых культур.

Выравнивание белков и идентификация прототипных пептидов

Выравнивали все известные белки-хордеины в базе данных Uniprot и предполагаемые белки-хордеины в базе данных TIGR. Внутри каждого семейства (B, C, D или γ) пептиды, которые были распространены, выбирали в качестве представителя семейства. Для каждого пептида определяли MRM-переходы, в которых значение m/z предшествующего иона (Q1) основывалось на размере и ожидаемом заряде, а значения m/z фрагментарных ионов (Q3) предсказывали с использованием шаблонов фрагментации и/или данных, собранных в последовательностях операций по определению характеристик. В предварительных анализах использовали вплоть до шести переходов, MRM-переходы детализировали и отбирали два лучших MRM-перехода на пептид для использования в конечном методе, причем наиболее интенсивный MRM-переход использовали как количественный параметр, а второй наиболее интенсив-

ный переход использовали как качественный параметр.

Масс-спектрометрия с MRM

Эксперименты с MRM применяли для количественного определения происходящих из хордеинов триптических пептидов. Для обоих IDA- и MRM-иницированных экспериментов MC/MC скорость сканирования устанавливали 1000 Да/с и пептиды фрагментировали в ячейке столкновений с газом азотом с использованием бегущей энергии столкновения, в зависимости от размера и заряда предшествующего иона. Количественного определения пептидов хордеинов достигли с использованием спланированных экспериментов по MRM-сканированию, используя окно детекции на 120 с для каждого MRM-перехода и время цикла 1 с. Первый квадруполь использовали для выбора соотношения масса-заряд (m/z) аналита, так называемого предшествующего иона. Предшествующий ион потом передавался в ячейку столкновений (второй квадруполь). Происходила индуцированная столкновениями диссоциация (CID), приводившая к получению фрагментированных ионов, которые передавались на третий квадруполь. Вторая стадия отбора по массе происходила специфично, ориентируясь на значения m/z известных фрагментированных ионов. Две стадии отбора по массе известны как Q1 и Q3, привязываясь к квадрупольям, в которые они попадают. Таким образом, переход от Q1 к Q3, известный как MRM-переход, является высоко-специфичным и избирательным для выбираемого аналита.

Относительное количественное определение хордеинов

Относительное количественное определение каждого хордеина проводили интегрированием площади пика наиболее интенсивного MRM-перехода для каждого пептида. Среднюю площадь пиков определяли получением среднего из двух повторностей инъекций (в разные дни) из бутылок А и В (представляющих биологические повторности). Результаты представлены в виде процентного содержания каждого белка хордеина относительно среднего содержания хордеина во всех содержащих глютен видах пива.

Пример 2. Определение характеристик хордеинов в ячменной муке.

Хордеины, экстрагированные из ячменной муки (сорт дикого типа Sloop) солюбилизацией в спиртовом растворе, очищали FPLC, как описано в примере 1. Очищенные фракции хордеинов восстанавливали, алкилировали и подвергали расщеплению трипсином или химотрипсином. После ферментативного расщепления субфракцию до 10 кДа анализировали методом ЖХ-МС/МС для идентификации хордеинов, присутствовавших в очищенной фракции проламинов из муки, для получения полного набора белков хордеинов, которые ожидаемо могли быть найдены в пиве, сваренном из этой муки. Используя уровень ложноположительных результатов (FDR) 1%, после расщепления трипсином всего идентифицировали 144 белка, а после расщепления химотрипсином всего идентифицировали 55 белков.

В табл. 1 перечислены белковые продукты хордеинов, обнаруженные в муке после расщепления трипсином. Среди обнаруженных наиболее распространенных белков были ранее опубликованные В3-хордеин (№ доступа P06471, Kristoffersen et al., 2000), γ -3-хордеин (P80198, Fasoli et al., 2010) и предполагаемый γ -1-хордеин (P17990, Cameron-Mills et al., 1988). Аналогичным образом обнаружили в избытке D-хордеин (Uniprot: Q84LE9, Gu et al., 2003). Другие обнаруженные менее распространенные белки включали два γ -хордеина и В1-хордеин, которые отсутствовали как в базе данных NCBI, так и в Uniprot (табл. 1). Эти белки идентифицировали поиском в специально разработанной базе данных, содержащей транслируемые белки зерновых культур из нуклеотидных элементов в NCBI, индексов генов TIGR или наборов транскриптов растений TIGR. Обнаружили несколько пептидов, соответствовавших предполагавшимся γ -глиадину и глютеинам (из пшеницы) и авениноподобному белку-А (из пшеницы и колоницы). Сообщалось, что авениноподобные А-белки должны присутствовать в пиве (Picariello et al., 2011) на основании данных детекции пептида из 15 аминокислот QQQCQPLAQISEQAR, SEQ ID NO:5, получавшегося в результате триптического расщепления полосы белка массой 16-17 кДа, выделенного электрофорезом с ДСН-ПААГ. Эта пептидная последовательность совпадала с последовательностью единственного белка из ячменя при поиске с помощью BLASTp, вместе с дополнительным пептидом из 13 аминокислот (ак), совпавшим с такой же предполагаемой белковой последовательностью (Uniprot: F2EGD5). При картировании также обнаружен пептид из 11 ак MVLQTLPSMCR SEQ ID NO: 6, соответствующий авениноподобному А-белку (Uniprot: Q2A782) из *Aegilops cylindrica* (собирательное название колоницы). Последующий поиск в базе данных транслируемых белков EST (TIGR) выявил белок H. vulgare, который объяснил присутствие пептида из 11 ак. На основании гомологии между предполагаемым авениноподобным белком-А и белками γ -хордеинов они были включены в последующие анализы.

Идентификации по отдельным белкам указали на присутствие С-хордеинов внутри фракции хордеинов, однако выравнивание последовательностей известных белков С-хордеинов выявило отсутствие сайтов триптического расщепления внутри этих богатых глютамином белков. Вследствие этого, химотриптическое расщепление фракции хордеинов привело к идентификации С-хордеинов с вплоть до 80% перекрытия последовательностей (табл. 2), подчеркивая необходимость поиска альтернативной стратегии расщепления для определения свойств этого класса хордеинов.

Таблица 1. Белки проламины, идентифицированные в очищенной FPLC фракции ячменной муки после расщепления трипсином

№ доступа Uniprot	№ доступа NCBI	№ доступа TIGR	Название	Оценка	Перекр ывание	Пептиды
-	-	BE454297	В3-хордеин ***	57.03	87,1	52
P80198	1708280	TA29416_4513	γ-хордеин-3	38.40	54,0	32
Q841.E9	75147012	TA30219_4513	D-хордеин **	34,70	55,6	41
P17990	123464	-	γ-хордеин-1	27.70	74,7	23
-	-	TA30139_4513	γ-хордеин ***	18.95	45,5	24
Q40026	75220903	TA29493_4513	В1-хордеин **	8,58	46,6	19
Q4G3S1	122220129	-	В3-хордеин *	5,55	15,7	10
P06472	123460	-	С-хордеин *	4,56	23,9	4
C7FB16	255348358	-	В-хордеин **	4,00	22,4	22
Q2A782	122238432	-	Авениноподоб ный А-белок *	4,00	14,4	2
F2XAR6	327365751	-	γ-глиадин **	3,89	9,5	3
-	-	TA29452_4513	В1-хордеин ***	3,87	52,2	18
P17991	123461	-	С-хордеин *	3,87	95,8	3
-	-	AJ433315	γ-хордеин ***	3,53	99,1	19
P06471	123459	HVB3HORD	В3-хордеин	2,00	73,1	42
B9VSI17	222538169	-	D-хордеин (сходный с глютелином с ВММ) **	2,00	16,1	9
Q3YAF9	122217636	-	В-хордеин **	2,00	21,7	8
B5A818	-	-	В-хордеин (сходный с	2,00	27,2	7
			глютелином с НММ) **			
D4HNB5	-	-	В-хордеин (сходный с глютелином с НММ) **	2,00	13,2	4
Q8S3W0	75159492	-	D-хордеин (сходный с глютелином с ВММ) **	2,00	5,0	6
F2EGD5	326501830	-	Авениноподоб ный А-белок *	2,00	16,2	2

Перечислены номера доступа для каждого белка:

*указывает на то, что идентификация белка подтверждена аннотированным доказательством транскрипта (Uniprot);

**указывает на то, что идентификация белка подтверждена предполагаемым белком, происходящим из генома (Uniprot);

***указывает на то, что идентифицирован новый белок при поиске в базе данных по сравнению с неаннотированными EST из TIGR.

Таблица 2. Белки проламины, идентифицированные в очищенной FPLC фракции ячменной муки после расщепления химотрипсином

№ доступа Uniprot	№ доступа NCBI	№ доступа TIGR	Название	Оценка	Перекрывание	Пептиды
P06471	123459	HVB3HORD	В3-хордеин	85.95	86,4	51
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-хордеин **	54,28	36,2	28
Q41210	75102504	-	С-хордеин **	50,10	88,7	44
P80198	1708280	TA29416_4513	γ-хордеин-3	36,38	69,9	19
Q40053	19001	-	С-хордеин (Hor1-17) **	28,93	83,9	41
-	-	TA30139_4153	γ-хордеин ***	21,31	59,2	11
P06470	123458	-	В1-хордеин	10,13	25,1	14
Q0PIV6	110832715	-	В-хордеин **	10,00	62,4	22
P17990	123464	-	γ-хордеин-1	8,00	50,9	7
P17992	123462	-	С-хордеин *	6,02	65,1	7
Q571R2	75271341	-	С-хордеин (сходный с σ-глиадином) *	4,00	61,3	3
-	-	TA29452_4513	В1-хордеин ***	2,13	59,4	14
C7FB16	255348358	-	В-хордеин **	2,02	61,9	15
-	-	TA28105_4153	Сходный с С-хордеином ***	2,01	53,4	1
-	-	BG416634_F0	В3-хордеин ***	2,00	81,5	32
-	-	B1950745_F1	В3-хордеин ***	2,00	33,6	15
-	-	TA29459_4513	В-хордеин (сходный с GBSS Wх-ТмА) ***	2,00	60,9	12
Q5PU42	56126405	-	В-хордсин (сходный с глютеином с НММ) **	2,00	22,6	6
Q4G3S5	57118089	-	В3-хордеин *	2,00	24,0	6

Перечислены номера доступа для каждого белка:

*указывает на то, что идентификация белка подтверждена аннотированным доказательством транскрипта (Uniprot);

**указывает на то, что идентификация белка подтверждена предполагаемым белком, происходящим из генома (Uniprot);

***указывает на то, что идентифицирован новый белок при поиске в базе данных по сравнению с неаннотированными EST из TIGR.

Пример 3. Определение свойств хордеинов в сусле и пиве.

Потом проводили анализ сусле - жидкости, экстрагированной в процессе затирания во время варки пива, и пива и идентифицировали сходный набор проламинов (табл. 3). Всего идентифицировали 27 белков в сусле и 79 белков в пиве, наиболее распространенные белки были белком 1 неспецифического переноса липидов (LTP1) и ингибиторами α-амилазы/трипсина (CMd, CMb, CMa). Белки-глутены, идентифицированные в сусле, включали авениноподобный А-белок (18 пептидов), γ-хордеин-3 (10 пептидов)

и D-хордеин (4 пептида), которые ранее обнаружили в обогащенной фракции хордеинов. Однако примечательно, что >50% пептидов были семи-триптическими (расщепленными на одном конце по сайту, отличающемуся от Lys/Arg), что предполагает значительную деградацию белков, прошедшую в течение процесса варки пива. Обнаружен авениноподобный А-белок (№ доступа в базе данных GenBank BE195337), идентифицированный при поиске в базе данных EST, с >60% перекрытием последовательностей (12 пептидов), увеличивая достоверность этой идентификации белка.

Примечательно, что в пиве до порога обнаружения отсутствовали белки С-хордеины, но чтобы удостовериться, что это не ложноположительный результат по причине низкого количества триптических сайтов, выполняли химотриптическое расщепление, которое подтвердило отсутствие в пиве С-хордеинов (табл. 3). Предположительно, отсутствие С-хордеинов связано с их нерастворимостью в воде. С-хордеины состоят из множества октапептидных повторов с консенсусной последовательностью PQQPFPQQ SEQ ID NO: 7 придающей им высокую нерастворимость. В сусле идентифицировали многие из продуктов деградации С-хордеинов, но они не сохранялись после этапов варки и фильтрации, приводящих к получению пива.

Для того, чтобы охарактеризовать пептидные фрагменты, сусло и пиво пропускали через фильтр с отсечением по молекулярной массе 10 кДа и анализировали без ферментативного расщепления. При 1D-ПААГ анализе выявили, что этап фильтрации был эффективен для удаления белков из пива. МС-анализ выявил присутствие нескольких усеченных или деградировавших продуктов хордеинов. В табл. 4 перечислены идентифицированные пептидные фрагменты. В дополнение к пептидам хордеинов в пиве и сусле идентифицировали пептиды, происходящие из большого количества белков ячменя, включавших серпин-З4, белок 1 неспецифического транспорта липидов, α -амилазу, β -амилазу, хордоиндолы (B1, B2) и GAPDH (перечислены в табл. 4 и дополнительной табл. 2 в статье Colgrave et al., 2012). Интересно, что было большое количество фрагментов С-хордеина, обнаруженных в сусле, при лишь следовом содержании пептидов С-хордеинов, выявленных в пиве.

Определение свойств пива в отсутствие ферментативного расщепления четко демонстрирует, что, в дополнение к интактным хордеинам, присутствовало большое количество частично деградировавших фрагментов хордеинов, и они также могут влиять на целиакальную токсичность. Многие из этих фрагментов пептидов содержали серии Gln и Pro, которые могут вызывать иммунологический ответ в отношении целиакии. Примеры обнаруженных потенциальных иммуногенных пептидов включают FVQPQQQPFPLQPHQP (авениноподобный А-белок; GenBank: TA31086, SEQ ID NO: 8), YPFQPPQPFPPWQQPT (γ -1-хордеин; P17990, SEQ ID NO: 9), LERPQQLFPPQWQPLPQQPP (γ -3-хордеин; P80198, SEQ ID NO: 10) и LIIPQQPQQPFPLQPHQP (С-хордеин; P17991, SEQ ID NO: 11), где подчеркнутая последовательность обладает высокой гомологией с иммуногенными пептидами, опубликованными ранее (Tye-Din et al., 2010; Kahlenberg et al., 2006).

Таблица 3. Белки проламины, идентифицированные в сусле и пиве

Проламины, идентифицированные в сусле (расщепление трипсином)						
№	№ доступа	№ доступа	Название	Оценка	Перекр	Пептиды
доступа	NCBI	TIGR			ывание	
Uniprot						
F2EGD5	326501830	-	Авениноподобный А-белок *	29,33	41,6	18
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -хордеин-3	18,05	33,2	10
-	-	BE195337	Авениноподобный А-белок ***	14,00	47,0	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-хордеин **	8,08	8,9	4
Проламины, идентифицированные в пиве (расщепление трипсином)						
№	№ доступа	№ доступа	Название	Оценка	Перекр	Пептиды
доступа	NCBI	TIGR			ывание	
Uniprot						
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -хордеин-3	55,62	53,6	33
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-хордеин **	30,16	22,2	23
P06471	18914	HVB3HORD	B3-хордеин	17,81	24,6	9
P17990	123464	-	γ -хордеин-1 *	16,98	31,9	9
-	-	BE195337	Авениноподобный А-белок ***	15,66	64,6	12
F2EGD5	326501830	-	Авениноподобный А-белок *	8,06	35,3	8
Q4G3S5	57118089	-	B3-хордеин *	5,48	12,6	6
Q40026	75220903	TA29493_4513	B1-хордеин **	2,01	8,6	7
Q94IL5	75250230	-	D-хордеин (сходный с глютеином с ВММ) **	2,00	4,6	8
Проламины, идентифицированные в пиве (расщепление химотрипсином)						
№	№ доступа	№ доступа	Название	Оценка	Перекр	Пептиды
доступа	NCBI	TIGR			ывание	
Uniprot						
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -хордеин-3	19,75	56,1	12
Q40022	829269	-	B1-хордеин *	13,80	51,4	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-хордеин **	12,00	26,0	6
P17990	123464	-	γ -хордеин-1 *	5,59	22,5	3
F5A7G6	-	-	B-хордеин (сходный с глютеином с НММ) **	2,00	23,2	5
Q6EEZ0	-	-	γ -хордеин-3 **	2,00	25,8	2

Перечислены номера доступа для каждого белка:

*указывает на то, что идентификация белка подтверждена аннотированным доказательством транскрипта (Uniprot);

**указывает на то, что идентификация белка подтверждена предполагаемым белком, происходящим из генома (Uniprot);

***указывает на то, что идентифицирован новый белок при поиске в базе данных по сравнению с неаннотированными EST из TIGR.

Таблица 4. Пептиды, происходящие из белков хордеинов, обнаруженные в субфракции пива 10 кДа

Название ^b	Дос- тов.	Пептид	m/z	Масса	Δm (м.д.)
D-хордеин (Q84LE9 **)	99	RVVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 16)	891,99	1781,97	13,41
	99	VVDQQLVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 17)	870,45	1738,89	19,72
	99	VVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 18)	813,93	1625,85	5,17
	99	VVDQQLVGQLPW (SEQ ID №: 19)	691,38	1380,74	2,46
	99	QLVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 20)	649,85	1297,68	16,25
	99	QLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 21)	593,30	1184,59	22,03
	99	LVGQLPWSTGLQM (SEQ ID №: 22)	715,37	1428,73	12,46
	99	LVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 23)	585,83	1169,65	5,55
	99	LVGQLPWSTG (SEQ ID №: 24)	529,28	1056,54	14,86
	99	VGQLPWSTGLQM (SEQ ID №: 25)	658,83	1315,64	14,06
	99	VGQLPWSTGL (SEQ ID №: 26)	529,28	1056,54	16,75
	99	(p)QLAAQLPAMCRLEGS[ГексNAc (SEQ ID №: 27)]	887,41	1772,80	22,05
	99	VVRQYEQQTEVPSKGGSFYPGGT APP (SEQ ID №: 28)	927,12	2778,35	5,79
γ-3-хордеин (P80198)	99	FVLPQQQAQFKVVGS (SEQ ID №: 29)	838,46	1674,90	4,24
	99	FVLPQQQAQF (SEQ ID №: 30)	603,31	1204,61	12,54
	99	AIVMQQQVQQQVGHGF (SEQ ID	899,43	1796,85	26,60

		№: 31)			
	99	LER PQQL FPWQPLPQQPP (SEQ ID №: 32)	776,41	2326,19	12,21
	99	LFPQWQPLPQQPP (SEQ ID №: 33)	788,41	1574,82	6,03
	99	LQQLGQGMPIQL (SEQ ID №: 34)	663,85	1325,69	16,98
	95	VVGSLVIQT (SEQ ID №: 35)	458,27	914,53	9,84
γ-1-хордеин (P17990 *)	99	LQ QPQH QFPPTQQFPQRPh (SEQ ID №: 36)	777,39	2329,15	8,16
	99	Y PEQP Q QFP WQQPT (SEQ ID №: 37)	935,93	1869,84	16,15
	99	GVVQPQQLAQME (SEQ ID №: 38)	664,31	1326,61	41,08
	99	[p]Q PQH QFPPTQQFPQRP (SEQ ID №: 39)	691,33	2070,98	9,90
Авенинопо добный А-белок (BF195337 ***)	99	FVQP QQQ VPVEITR (SEQ ID №: 40)	834,94	1667,87	19,61
	99	FVQP QQQ VPVEI (SEQ ID №: 41)	706,37	1410,72	18,78
С-хордеин (P17991 *)	98,2	LIPQ QPF PLQPHQP (SEQ ID №: 42)	1053,59	2105,17	14,82
	99	IIPQ QPF PLQPHQP (SEQ ID №: 43)	997,05	1992,08	13,40
В3-хордеин (P06471)	98,4	VQVQIPFVHPSI (SEQ ID №: 44)	682,38	1362,74	16,22
Авенинопо добный А-белок (F2EGD5 *)	99	SFGQ PQQ VPVEVMR (SEQ ID №: 45)	865,43	1728,84	13,0
С-хордеин (Q40053 *)	95,8	IIPQ QPF PLQ QPF Q QPF Q QPL PQ (SEQ ID №: 46)	1081,25	3240,73	11,08
С-хордеин (TA28105 ***)	96,4	IP I Q PQ [деза]Q PF Q QPF (SEQ ID №: 47)	808,40	1614,79	30,53

Эпитопы, отмеченные жирным шрифтом, показывают высокую гомологию последовательностей с эпитопами глютена, распознанными MAb Mendez R4, по сравнению с протаминами ржи (QQPFP (SEQ ID NO: 12), QQQFP (SEQ ID NO: 13), LQFPF (SEQ ID NO: 14), QLPFP (SEQ ID NO: 15))^a. Эти пептиды могут вызывать иммунный ответ у пациентов с ЗЦ.

a) Kahlenberg et al. (2006).

b) Перечислены номера доступа для каждого белка:

*указывает на то, что идентификация белка подтверждена аннотированным доказательством транскрипта (Uniprot);

**указывает на то, что идентификация белка подтверждена предполагаемым белком, происходящим из генома (Uniprot);

***указывает на то, что идентифицирован новый белок при поиске в базе данных по сравнению с неаннотированными EST из TIGR.

Пример 4. Относительное количественное определение хордеинов в пиве методом масс-спектрометрии с MRM

Определение протеомных свойств очищенных хордеинов и пива в примерах 2 и 3 дало возможность установить основные белки-хордеины, присутствовавшие в ячмене. Идентифицировали метод мониторинга множественных реакций (MRM) в качестве полезного инструмента для количественного определения пептидов и белков. В этом методе после триптического расщепления белков протеолитические фрагменты хроматографически разделяли методом ВЭЖХ и анализировали методом масс-спектрометрии с MRM. Первый квадруполь (Q1) выбирал значение первого пептида m/z (масса предшественника) и пе-

редавал этот ион в ячейку столкновений (Q2). Индуцированная столкновениями диссоциация приводила к получению серий фрагментарных ионов, связанных с аминокислотной последовательностью протеолитических фрагментов. Потом диагностические фрагментарные ионы отбирали в третьем квадруполе (Q3) и передавали на детектор, позволяющий количественно определять представляющие интерес пептиды. Как правило, применяли три MRM-перехода на пептид и анализировали по меньшей мере два пептида на белок.

Из каждого из семейств белков выбирали одну изоформу для мониторинга содержания глютена в сортах пива, сваренных из селективно-выведенных линий ячменя (см. ниже). Для разработки количественного анализа выбирали множество триптических пептидов (≥ 2 пептидов/белок). В исследовательских экспериментах, в которых эти пептиды были ранее обнаружены, m/z пептида и информацию о фрагментарном ионе использовали для определения в предусмотренном MRM-переходе. Набор пептидов, которые первоначально не были идентифицированы, включали в MRM-анализ таким образом, чтобы использовалось минимум два пептида на белок. В таких случаях времена удерживания не были известны, и нельзя было спланировать MRM-переходы в экспериментах первого прохода. Определяли времена удерживания пептидов, и использовались в последующих экспериментах спланированных MRM-переходов.

Пиво, полученное из единственного элитного австралийского пивоваренного ячменя ("Sloop"), использовали для разработки и усовершенствования метода MRM, поскольку оно содержало полный набор белков хордеинов, тогда как варианты ячменя (Risø 56 и Risø 1508), как ожидалось, имели низкое содержание или были лишены В- и С-хордеинов. Когда виды пива из образцов зерна ячменя дикого типа и двух мутантных по хордеинам сортов зерна ячменя (Risø 56 и Risø 1508) проанализировали с использованием MRM-анализа, в пиве из ячменя дикого типа были отчетливо обнаружены восемь отобранных пептидов (три MRM-перехода на пептид). В пиве из Risø 56 выявлено приблизительно трехкратное уменьшение количества пептидов D-хордеинов, а пептиды В-хордеинов до порога обнаружения отсутствовали. В пиве из Risø 1508 выявлено дополнительное уменьшение количества каждого измеренного пептида, но обнаружено следовое количество авениноподобного А-белка.

Воспроизводимость аналитического метода оценивали исследованием пива из одного сорта ячменя ("Sloop"). Во-первых, пиво подвергали нескольким циклам замораживания-оттаивания (любое количество из 1, 10, 20 или 50 циклов) и не обнаружили статистически значимой разницы (коэффициент вариации, КВ, $<15\%$) для площадей пиков для каждого из проходивших мониторинг MRM-переходов, даже после 50 циклов. Во-вторых, эффективность расщепления исследовали в шести повторностях расщеплений, давших КВ $<15\%$. Аналитическую воспроизводимость оценивали проведением инъектирований четырех повторностей для каждого расщепления с КВ $<15\%$. Наконец, оценивали вариацию содержания хордеинов между двумя разными бутылками пива и нашли ее равной $<10\%$.

Анализ коммерческих сортов пива

Провели дополнительную валидацию метода MRM для количественного определения хордеинов в пиве анализом содержания глютена в выборке из 60 коммерческих видов пива, включая виды пива, маркированные как имеющие низкое содержание глютена и безглютеновые. Дублированные образцы из отдельных бутылок обрабатывали для восстановления, алкилирования и расщепления (пример 1) и анализировали методом масс-спектрометрии с MRM. На фиг. 2 показано относительное количественное содержание авениноподобных А-белков (А), В-хордеинов (В, С), D-хордеинов (D) и γ -хордеинов (Е) в коммерческих видах пива по сравнению с пивом из Sloop. По сравнению со средними значениями для безглютеновых видов пива в коммерческих видах пива обнаружено варьирование в типе (присутствие семейств хордеинов) и количества (между 1-380% по ср. со средним для любого заданного белка хордеина). Восемь видов пива (№№ 17, 47, 49, 50, 51, 52, 58 и 60) были маркированы как безглютеновые, поскольку они сварены из солода сорго, теффа, риса, проса или кукурузы. В этих зерновых культурах отсутствуют белки глютены, присутствующие в ячмене и пшенице. MRM-анализ подтвердил, что они были лишены содержания белков хордеинов и искомым белкам, родственными хордеинам (авениноподобный А-белок). Виды пива 17 и 50-52 изготовлены на основе сорго, на пиве 47 не указывалось из чего оно изготовлено, пиво 49 изготовлено из проса, пиво 58 сварено из солода сорго, теффа и риса, а пиво 60 было пивом не зернового происхождения. При проверке двух видов пива (57 и 59) они были классифицированы как имевшие низкое содержание глютена (<10 м.д.), относительное содержание хордеина не отличалось от среднего содержания хордеина среди данного диапазона исследованных видов пива. В пиве 57 выявлено низкое содержание авениноподобного А-белка ($\sim 50\%$ по ср. со средним), но неожиданно выявлено значительные уровни пептидов, происходящих из В1- ($>300\%$ по ср. со средним), D- ($\sim 105\%$) и $\gamma 3$ -хордеинов ($\sim 62\%$). В пиве 59 выявлено низкие, но значительные уровни В1-, D- и γ -хордеинов (55, 42 и 92% соответственно) и эквивалентное содержание авениноподобного А-белка по сравнению с обнаруженными в содержащих глютен видах пива.

Выводы

Виды пива, изготовленные из ячменя, содержали глютен, происходящий из зерна, использованного в процессе варки пива. Уровень глютена в пиве может измеряться с использованием ИФА, однако суще-

ствует много ограничений, связанных с точным измерением содержания хордеинов с использованием технологии ИФА. В вышеуказанных примерах был разработан масс-спектрометрический анализ для определения свойств полного набора хордеинов в очищенных препаратах хордеинов, суслу и пива и проведения идентификации наиболее распространенных белков хордеинов. Анализ с использованием масс-спектрометрии был робастным и чувствительным для измерения хордеина (глутена) в муке, сусле и пиве и мог легко применяться для солода.

Пример 5. Идентификация нулевой мутации в гене *Hor3* ячменя.

Полипептид D-хордеина ячменя массой 105 кДа кодируется геном *Hor3* на длинном плече хромосомы 1Н (Gu et al., 2003). Дикая раса ячменя, обозначенная *Ethiopia R118*, идентифицирована как не накапливающая D-хордеины (Brennan et al., 1998) и получена из общедоступной коллекции зародышевой плазмы в Центре открытых коллекций Джона Иннеса (№ доступа 3771). Эта линия была дикой расой ячменя, в высшей степени неподходящей для коммерческого производства зерна.

Зерно *Ethiopia R118* выращивали в теплице. Обнаружено, что полученные растения сегрегировали на 2-рядный и 6-рядный фенотипы и на черные пигментированные семена и зеленые семена. Выбирали двухрядную линию, которая воспроизводила зеленые семена, и скрещивали ее с сортом *Sloop*. Отбирали половины зерен F2, которые были отрицательными по продукции D-хордеина. Растения этой линии повторно скрещивали с диким типом *Sloop* и снова отбирали растение F2, которое было нулевым по D-хордеину. Это растение повторно скрещивали с сортом *Sloop* и растение-потомок снова повторно скрещивали для получения линии BC₂, которая была отрицательной по продукции D-хордеина в генетическом окружении, которое составило около 87,5% генома *Sloop*.

Ген, кодирующий D-хордеин, амплифицировали из геномной ДНК, выделенной из каждого из отрицательных по D-хордеину растений *Sloop* BC₂, полученных из сорта *Ethiopia R118* и дикого типа *Sloop*. Выделение провели методом ПЦР при стандартных условиях и создали серии из 3 перекрывающихся фрагментов. Пары праймеров, использованные при амплификации были такими.

Фрагмент 1.

5' Dxop1 GACACATATTCTGCCAAAACCCC (SEQ ID NO: 60) и
3' Dxop3 ACGAGGGCGACGATTACCGC (SEQ ID NO: 61)

Фрагмент 2.

5' Dxop1b GAGATCAATTCATTGACAGTCCACC (SEQ ID NO: 62) и
3' Dxop1 CTTGTCCTGACTGCTGCGGAGAAA (SEQ ID NO: 63)

Фрагмент 3.

5' Dxop2 GCAACAAGGACACTACCCAAGTATG (SEQ ID NO: 64) и
3' Dxop2 GCTGACAATGAGCTGAGACATGTAG (SEQ ID NO: 65)

Очищали продукты амплификации и определяли нуклеотидную последовательность из каждого растения. Подобранный последовательность из сорта *Sloop* была 2838 п.н. длиной SEQ ID NO: 72, а последовательность, полученная из *Ethiopia R118*, была 2724 п.н. длиной SEQ ID NO: 73. Предполагаемый стартовый кодон трансляции ATG для обоих белков находился в положении 398-400 соответствующих последовательностей. Для сорта *Sloop* кодон терминации находился в нуклеотидном положении 2641-2643, кодирующем белок из 747 аминокислотных остатков. Анализ последовательности из сорта *Ethiopia R118* выявил, что по сравнению со *Sloop* было изменение С на G в положении 848 (положение 450 относительно стартового кодона), которое внедрено в стоп-кодон TAG внутри рамки в ген *Hor3*, которое приводило к усечению в белке полипептида в положении 150 (фиг. 3). Это усечение полипептида D-хордеина находилось перед доменом, богатым пролином и глутамином, который содержит эпитопы, идентифицированные как иммуногенные для проявления целиакии.

Эта нуклеотидная замена ликвидирует сайт KpnI, который присутствовал в нуклеотидной последовательности дикого типа в сорте *Sloop*, и позволила разработать кодоминантный маркер CAPS. С этой целью амплифицировали фрагмент ДНК из 272 п.н. с использованием праймеров

5' Dxop-маркер (GGCAATACGAGCAGCAAAC (SEQ ID NO: 66) и

3' Dxop-маркер (CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC (SEQ ID NO: 67) (фиг. 4). Продукты амплификации потом инкубировали с ферментом рестрикции KpnI и проанализировали электрофорезом на агарозных гелях. Фрагмент из ячменя дикого типа *Sloop* расщепляли KpnI для получения двух фрагментов из 164 п.н. и 108 п.н. В противоположность этому, фрагмент из 272 п.н. из D-нулевого сорта *Ethiopia R118* не расщеплялся. Следовательно, этот способ отчетливо распознавал аллели дикого типа и нулевые аллели гена, кодирующего D-хордеин.

Пример 6. Идентификация молекулярного маркера для делеционной мутации в локусе *Hor2* ячменя.

Локус *Hor2* на коротком плече хромосомы 1Н в ячмене содержит семейство из около 20-30 генов, каждый кодирующий В-хордеин в диапазоне размеров около 36-45 кДа (Anderson et al., 2013). Линия *Risø 56* является индуцированной гамма-излучением мутацией, которая имеет делецию из около 86 п.н., включая все или почти все гены В-хордеинов Kreis et al., (1983). Эту мутацию использовали для создания двойной мутации *Hor2-Lys3a*, как ранее описано в статье Tanner et al. (2010), экспрессирующей значи-

тельно уменьшенные уровни всех хордеинов.

Конструировали молекулярный маркер и испытывали его для выявления локуса *Hor2* дикого типа и различения его от *Hor2*-делетированного локуса следующим образом с использованием стандартных условий ПЦР. Отсутствие полосы ПЦР для В1-хордеина из 800 п.н. было диагностическим признаком отсутствия (делеции) локуса *Hor2*, т.е. наличия мутантной аллели *Hor2*. Пары праймеров, использованные при амплификации были такими:

3' В1 Хор TCGCAGGATCCTGTACAACG (SEQ ID NO: 68);

5' В1 Хор CAACAATGAAGACCTTCCTC (SEQ ID NO: 69).

Для каждого образца ДНК также выполняли контрольную реакцию ПЦР, которая воспроизводила характерную полосу ПЦР из 450 п.н., указывавшую на присутствие локуса гамма-хордеина и подтверждавшую, что качество образца ДНК было достаточным для реакции на *Hor2*, используя пары праймеров:

5' гамма Хор 3 CGAGAAGGTACCATTACTCCAG (SEQ ID NO: 70);

3' гамма 3 целый AGTAACAATGAAGGTCCATCG (SEQ ID NO: 71).

Пример 7. Создание трижды нулевого мутанта ячменя.

Растения F5 дважды мутантной по *Hor2-Lys3a* линии ячменя, идентифицированные как G1* в публикации WO 2009/021285, выращивали в теплице для получения потомства F6. Растения F6 потом выращивали в полевых условиях для получения потомства F7. Для комбинирования мутаций *Hor2-Lys3a* с нулевой мутацией *Hor3* растения генерации F7 скрещивали с отрицательными по D-хордеину растениями BC₂, произошедшими из сорта Ethiopia R118 (пример 5) и поколения F1, самоопыленного для получения семян F2. Семена F2 разрезали пополам, половины с зародышами проращивали и проводили скрининг всходов методом ПЦР на В- и D-хордеины, как в примерах 5 и 6, и на гамма-хордеин. Оставшуюся половину каждого семени, содержащую эндосперм, погружали в раствор, содержащий 8М мочевины, 1% ДТТ, и экстрагированные белки разделяли электрофорезом с ДСН-ПААГ. Отсутствие характерных полос белков с массой приблизительно 50 кДа указывало на отсутствие белков С-хор. Из около 300 растений F2 идентифицировали три трижды нулевых мутанта, обозначенных T1, T2 и T3. Ожидаемая частота для комбинации трех рецессивных мутаций, каждой в гомозиготном состоянии, по генетике Менделя составила 1/64, что предполагает, что локусы *Hor2* (В-хордеины) и *Hor3* (D-хордеины) разделены на хромосоме 1Н достаточно сильно для прохождения легкой рекомбинации.

Эти три растения, которые были гомозиготными по каждой из трех мутаций (*Hor2-Lys3a-Hor2*), обозначенные T1, T2 и T3, поддерживали и размножали через три генерации поколения одного семени, отбирая в каждой генерации 12 самых тяжелых семян. Средние массы семян из семян F3 этих линий составили: T1, 38,2 мг; T2, 37,0 мг; T3, 39 мг. Измеряли урожайность семян на линию (1 г семян на 20 колосьев) и высоту растений. Растения, которые производили плохо наполненные колосья, отбрасывали. Отобрали две линии F4: T2-4-8 и T2-6-A5, провели дополнительные испытания в полевых условиях. Из них выбрали T2-4-8, как обладавшую немного лучшей урожайностью зерна, и обозначили ее как ячмень ULG3.0.

Важным фенотипом ячменного зерна, связанным с размером зерна, формой и индикатором урожайности зерна, является процентное содержание зерна, которое не проходит через сита с размерами меш 2,8; 2,5; 2,2 и 2,0 мм, особенно сито на 2,8 мм. Меньшее зерно делает переработку и осоложивание менее эффективными по сравнению с ячменем дикого типа. Этот фенотип называется "отсев 2,8 мм" и указывается как процентное содержание зерна, которое не проходит через конкретное сито. Для сортов дикого типа, таких как Sloop, параметр отсева 2,8 мм, как правило, составляет 95-98%. Для дефицитных по хордеинам линий, таких как двойной мутант *Hor2-Lys3a* (ULG2.0), параметр отсева 2,8 мм в большинстве случаев составил около 53%. Иногда, в зависимости от условий роста, например засухи, он был менее 10%, а большинство зерен могло проходить через сито 2,5 мм. Для ULG3.0 параметр отсева 2,8 мм составил около 54%. Средние массы (мг) выращенных в полевых условиях зерен составили: Sloop, 53,6±0,9, ULG2.0, 33,5±0,4; ULG3.0, 39,1±0,3. Следовательно, линия ULG3.0 обеспечила урожайность зерна 69% по сравнению с ULG2.0 с 50%, относительно сорта Sloop дикого типа (100%). Следовательно, линия ULG3.0 представила значительное улучшение урожайности зерна по сравнению с линией ULG2.0. Тем не менее, параметр отсева 2,8 мм остался проблемным вопросом для ячменя ULG3.0.

Пример 8. Создание дополнительных трижды нулевых мутантов ячменя с увеличенной урожайностью.

Хотя линия ячменя ULG3.0 продуцировала увеличенную урожайность зерна по сравнению с ULG2.0, все же требовалось ее дополнительно увеличить. В связи с чем растения ULG3.0 скрещивали с растениями сортов дикого типа Sloop, Baudin и Yagan, и растения трижды нулевых по хордеинам линий идентифицировали как содержавшие 50% каждой исходной зародышевой плазмы. Эти трижды нулевые по хордеинам линии перекрестно скрещивали и скрещивали также с сортами дикого типа Hindmarsh и Commander. Потомство, содержащее все три нулевые мутации, дважды повторно скрещивали с растениями Sloop, Baudin, Hindmarsh и Commander и несколькими гомозиготными линиями, воспроизведенные потомством одного семени. Из множества отобрали одну результирующую линию, которая была продуктивной, и обозначили ее как ячмень ULG3.1.

Из результатов перекрестных скрещиваний с растениями Sloop, Yagan и Baudin, выполнили второй цикл перекрестных скрещиваний для комбинирования генетических окружений всех трех исходных сортов, начиная с растений, каждое из которых содержало три нулевые мутации. Из растений F1 от перекрестных скрещиваний ожидали всего потомства, содержавшего все три мутации. Около 1000 семян F2 на породу высадили в борозды в полевых условиях и отбирали растения F2, которые были относительно более короткими и давали семена F3, которые были больше, с хорошо наполненными колосьями. Отбирали растения как раннего, так и позднего созревания. В последующей генерации, выросшей в полевых условиях, отбирали линии, которые дополнительно проявили относительно высокое содержание в зерне амилазы, относительно высокий уборочный индекс и длину колоса, оптимальную высоту (полукарлик), отсутствие полегания и устойчивость к заболеванию мучнистой росой. Из 1500 семейств выбрали около 20 наилучших. Данные по 20 наилучшим линиям представлены в табл. 5. Массы отдельных семян (масса зерновки) были значительно улучшены, превосходя массу ULG 3.0 до 41,8 мг/семя, с наибольшей массой семени 48,4 мг/семя, которую наблюдали для линии P12072-2. Это улучшение размера семян сопровождалось увеличенным уборочным индексом, при измерении эффективности образования семян около 40% имело наибольший уборочный индекс из 46,5% измеренных в линии P12124-1. Самое главное, процентное содержание отсева 2,8 мм также улучшено с 53,5% для ULG3.0 до более чем 80%, с наибольшим значением 97,3% для линии P12140-1.

Одну отобранную линию зафиксировали поколением одного семени для получения растений, которые гомозиготны по трем нулевым аллелям по *Hor2-Lys3a-Hor3*, и обозначили ее ULG3.2. Параметр отсева 2,8 мм для ULG3.2 находился в диапазоне 80-93% в нескольких повторностях, в которых рост в полевых условиях составил в сравнении около 97% для Sloop, 85% - для Hindmarsh, 96% - для сорта Oxford дикого типа и 98% - для Maratime.

Средние массы семян и их толщина были такими: ULG2.0, 33,4 мг, 2,4 мм; ULG3.0, 41,8 мг, 2,5 мм; ULG3.2, 47,2 мг, 2,8 мм.

Таблица 5. Второй отбор линий ULG 3.2, июнь 2012 г.

ID № растения	Средняя длина побега (см)	Средняя длина колоса (см)	Уборочный индекс (%)	Кол-во побегов	Масса зерновки	% отсева 2,8 мм
P12072-2	84,7	8,3	39,0%	9	48,4	88,3
P12132-1	83,0	8,2	43,9%	5	47,5	92,7
P12048-1	75,0	7,0	39,4%	8	47,2	86,7
P12122-2	74,3	6,7	35,0%	5	47,2	96,5
P12049-1	70,0	6,3	38,7%	12	46,5	93,6
P12125-1	78,0	7,7	42,0%	10	46,2	95,3
P12140-1	105,7	9,0	32,4%	15	45,9	97,3
P12055-2	57,0	5,8	36,3%	5	45,7	91,9
P12088-2	72,7	6,3	42,6%	8	45,4	90,7
P12125-2	71,7	5,3	45,3%	8	45,0	95,0

P12043-2	86,7	9,0	29,5%	12	44,7	85,4
P12050-1	64,3	6,0	36,5%	4	44,4	93,6
P12148-1	93,3	7,3	35,0%	14	44,2	90,0
P12149-1	103,3	8,0	34,7%	15	44,0	91,2
P12124-1	79,3	7,3	46,5%	8	43,7	96,8
P12152-2	98,3	9,0	34,8%	9	43,5	91,5
P12049-3	76,3	6,3	40,0%	7	43,2	92,4
P12100-2	79,3	6,3	46,5%	15	43,2	88,3
P12126-1	73,0	6,0	37,0%	10	43,1	98,0
P12122-1	64,7	6,0	45,4%	5	42,8	90,8
P12048-2	65,0	5,7	41,8%	4	42,5	93,9
P12148-2	90,3	6,3	33,3%	7	42,5	94,9
P12159-2	82,7	7,7	33,6%	12	42,4	83,5
P12139-1	113,7	8,3	33,9%	8	42,2	88,1
P12159-1	96,3	8,8	31,9%	14	41,7	94,1
P12139-2	89,3	7,7	34,4%	5	41,3	96,8
P12064-2	82,3	7,2	40,8%	11	41,2	92,4
P12120-2	75,0	6,8	39,6%	18	41,0	84,0
Критерий отбора		>4 <10	>35%	5> 20	> 40	>80%

Пример 9. Измерение содержания хордеинов у трижды нулевых мутантов ячменя.

Определение содержания хордеинов в муке из ULG3.0 методом масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (MRM-МС)

Для точного измерения содержания хордеинов использовали MRM-МС следующим образом. Перемалывали зерно или половины зерен для получения цельнозерновой муки, которая имела такой же состав, что и цельное зерно. Полипептиды проламинов из 20 мг образцов муки экстрагировали с использованием 200 мкл раствора, содержащего 55% (об./об.) изопропанола и 2% (мас./об.) дитиотреитола (ДТТ). Аликвоту экстракта, эквивалентную 5 мг муки, подвергали замене буферного раствора на раствор 8М мочевины в 0,1 М трис-НСl, pH 8,5 трехкратным центрифугированием с использованием фильтрующего элемента, с отсечением по MM 10 кДа. Цистеины в полипептидах алкилировали добавлением 100 мкл 50 мМ йодацетамида и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Буферный раствор заменяли на 100 мкл 50 мМ бикарбоната аммония, pH 8,5, и полипептиды расщепляли 10 мкл (20 мкг) трипсина в течение 18 ч при 37°C. Пептиды собирали фильтрацией через фильтр на 10 кДа, высушивали и растворяли в 30 мкл 1% (об./об.) муравьиной кислоты. Пептиды разделяли жидкостной хроматографией на ВЭЖХ Shimadzu Nexera с колонкой Phenomenex (Kinetex, 1,7 мкм, C18, 100×2,1 мм) с градиентом от 5 до 40% В в течение 10 мин при скорости потока 0,4 мл/мин. Растворитель А представлял собой 0,1% (об./об.) водную муравьиную кислоту, растворитель В представлял собой 90% (об./об.) ацетонитрил, содержащий 0,1% (об./об.) муравьиную кислоту. Элюат после ВЭЖХ непосредственно подавали на масс-спектрометр и MRM-анализ выполняли на масс-спектрометре 4000 QTRAP, нацеленном на обнаружение происходящих из хордеинов триптических пептидов. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Analyst v1.5 и программного обеспечения MultiQuant v2.0.2 (интегрирование площадей пиков).

На фиг. 5 показаны данные, полученные для отобранных В-хордеинов, С-хордеина, D-хордеина, гамма-3-хордеина (G3) и гамма-1-хордеина (G1). На фиг. 5 представлена средняя площадь пика для каждого пептидного MRM-перехода, нормализованного к содержанию в Sloop (100%), для четырех повторных инъектирования из каждой половины зерна из контрольного ячменя (дикий тип, сорт Sloop), однонулевых по хордеинам линий: Risø 56, Risø 1508 и D-нулевой линии, происходящей из сорта Ethiopia R118, дважды нулевой по хордеинам линии ULG2.0 и трижды нулевых линий T2-4-8 и T2-6-A5 (отмечено кругом). Для представления каждого семейства хордеинов выбирали по одному прототипному пептиду, а именно:

для В-хордеина, TLPTMCSVNVPLYR (SEQ ID NO: 48);

для D-хордеина, DVSPSCRPVALSQVVR (SEQ ID NO: 49);

для С-хордеина, LPQKFPVQQPF (SEQ ID NO: 50);

для G3-хордеина, QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 50)

и для G1-хордеина, CTAIDSIVHAIFMQQGR (SEQ ID NO: 51).

Эти пептиды встречались часто и были относительно распространены в ячмене дикого типа, исходя из чего и были выбраны.

Показано, что трижды нулевое зерно ULG3.0 из линии T2-4-8 и второй трижды нулевой линии T2-6-A5 не имело детектируемых уровней содержания В-, С-, D- или, наиболее удивительно, гамма-1-хордеина. Иначе говоря, обнаружено менее 1% содержания относительно дикого типа. Таким же образом гамма-2-хордеин не обнаруживался в зерне ULG3.0. В нем содержалось относительно низкое содержание гамма-3-хордеина (отмечено кругом), присутствовавшем на уровне около 20% по сравнению с содержанием G3 в сорте Sloop. Гамма-3 хордеин является минорным хордеином; содержание гамма-3 хордеина в Sloop намного меньше чем 1% от общего содержания хордеинов. Однонулевые и дважды нулевые зерна не накапливали соответствующий хордеин, например, как ожидалось, Risø56 и ULG2.0 не накапливали В-хордеины, а Risø1508 и ULG2.0, как ожидалось, не накапливали С-хордеины. В D-нулевом зерне проявилось содержание В- и С-хордеинов дикого типа, но не накапливался D-хордеин.

Когда повторили анализ с использованием нескольких различных пептидных последовательностей, в частности пептида D-хордеина AQLAALPAMCR (SEQ ID NO: 85), который представляет собой белок D-хордеина дикого типа, в направлении С-конца значительно дальше положения стоп-кодона в мутантном В-хордеине, то получили сходный результат (фиг. 6). В муке также отсутствовал авениноподобный А-белок.

Было ясно, что зерно, полученное из трижды нулевых по хордеинам T2-4-8 и T2-6-A5, не содержало детектируемые уровни В-, С-, D-хордеинов и отобранных гамма-1 (P17990) и гамма-2 хордеинов. Обнаружение гамма-1 и гамма-2 хордеинов было самым неожиданным для изобретателей, так как неизвестно, чтобы трижды нулевые мутантные линии содержали какие-либо мутации, которые не могли бы полностью заглушить соответствующие гены.

Низкое содержание хордеинов в зерне ULG3.0, определенное методом MRM, было подтверждено методом двухмерного гель-электрофореза следующим образом: 50 мкг спирторастворимого белка из экстрактов муки из каждой нулевой по хордеинам линии T2-4-8 и T2-6-A5, а также из контрольного ячменя сорта Risø 56, каждая проба с добавкой 1 мкг из полипептидных стандартов BCA landmark, ингибитора трипсина сои и миоглобина коня, окрашивали 0,006% (мас./об.) коллоидного Кумасси G250 согласно Tanner et al. (2013) и сравнивали со стандартными белками 20, 30, 40, 50, 60, 80 и кДа (М; набор белков сравнения, Invitrogen). Пятна вырезали из 2D-геля и из контрольной линии Risø 56 идентифицировали следующие белки методом масс-спектрометрии триптических пептидов: С-хордеин, гамма-2-хордеин (γ_2), гамма-3-хордеин (γ_3) и гамма-1-хордеин (γ_1). В гелях для зерна ULG3.0 идентифицировали предполагаемые положения гамма-1-, гамма-2- и гамма-3-хордеинов сравнением с гелем для Risø 56. В муке из ULG3.0 выявили только гамма-3-хордеин, остальные три полипептида обнаружены не были. Концентрацию гамма-3-хордеина в каждом пятне измеряли тремя методами: 1) как процентное содержание от всех объемов пятен для 50 мкг белка: среднее содержание γ_3 в ULG3.0 составило $13,5 \pm 1,6$ м.д.; 2) по отношению к интенсивности пятна для 1 мкг BCA: среднее содержание γ_3 в ULG3.0 составило $10,9 \pm 1,3$ м.д.; 3) по отношению к объему пятна для 1 мкг BCA: среднее содержание γ_3 в ULG3.0 составило $3,4 \pm 0,41$ м.д.

Низкое содержание хордеинов в зерне ULG3.0, определенное методом MRM, было дополнительно подтверждено методом ИФА следующим образом: 20 мг образцов цельнозерновой муки или эндосперма половин семян измельчали и трижды промывали 0,5 мл воды качества MilliQ встряхиванием на скорости 30/с в течение 3×30 с в 96-луночной вибрационной мельнице (Retsch GmbH, Rheinische) и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Проламины из образцов муки экстрагировали в спиртовой раствор, содержащий 0,5 мл 50% (об./об.) изопропанола/1% (мас./об.) ДТТ, для контрольных линий Sloop, Risø56, Risø1508 и для ULG2.0, трижды нулевых по хордеинам линий T1, T2 и T3 и потомства поколения одного семени из линий T2-4-8 и T2-6-A5. Концентрации белков определяли в соответствии с методом Bradford (1976) и для этого 40 нг (1900 нг для трижды нулевых линий зерна) спирторастворимого белка разбавляли раствором, содержащим растворители ELISA systems с постоянным избытком 0,2 мМ H_2O_2 , добавляемым для удаления любых остатков ДТТ из исходного экстракта. Растворы разбавленных белков добавляли в лунки планшета ИФА (ELISASystems, г. Винзор, Квинсленд, Австралия), промывали и проявляли при 37°C в течение 15 мин согласно инструкций производителя. Количество хордеина в контрольных экстрактах калибровали по сравнению со стандартом 0-50 нг общего белка Sloop. Содержание хордеина в трижды нулевых линиях калибровали по сравнению со стандартом 0-5 нг общего белка ULG2.0. Хордеины Sloop и ULG2.0 получали, как описано авторами Tanner et al. (2010).

По результатам метода ИФА общее содержание хордеинов дважды нулевых образцов муки составило 2,9% по сравнению с сортом Sloop дикого типа, тогда как содержание остаточных хордеинов в двух отобранных трижды нулевых по хордеинам линиях, T2-4-8 и T2-6-A5, составило 3,9 и 1,5 мкг/г (миллионных долей, м.д.; табл. 6), оба значения были значительно ниже законодательно разрешенного уровня FSANZ, равного 20 м.д., для глютена в безглютеновом пищевом продукте и приблизительно в 15000 раз ниже, чем в зерне сорта Sloop дикого типа.

Определение содержания хордеинов в пиве из ULG3.0 методом масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (MRM-MC)

Содержание хордеинов в пиве, сваренном из зерна ячменя ULG3.0, измерили методом MRM-MC, обнаружившим специфические пептидные последовательности с использованием методов, описанных в

примерах 3 и 4, с незначительными модификациями. Эти данные представлены на фиг. 7. Результаты анализов показали отсутствие авениноподобного А-белка, В1- и В3-хордеинов, D-хордеина и уменьшенное содержание гамма-1-хордеина и гамма-3-хордеина, поскольку они не были обнаружены, как превысившие фоновый шум при проведении масс-спектрометрии (фиг. 7). Эти анализы также показали отсутствие С-хордеина.

Таблица 6. Сводные данные по содержанию хордеинов в одно-, дважды и трижды нулевых линиях

Линия	мг хордеина/ г муки	% от Sloop
Sloop	56,6 ± 3,3	100%
Risø56	33,3 ± 1,1	58,8%
Risø1508	4,9 ± 0,26	8,7%
ULG2.0	1,67 ± 0,07	2,9%
T2-4-8 (ULG3.0)	0,0039 ± 0,0017	0,007%
T2-6-A5	0,0015 ± 0,0004	0,0027%

Определение содержания хордеинов в муке из ULG3.1 и ULG3.20 методом MRM-МС

Содержание хордеинов в муке, полученной перемалыванием зерен линии ULG3.1 и 10 перспективных линий ULG3.2, определяли методом MRM-МС, описанным для зерна ULG3.0. Половины зерен перемалывали в муку и белки проламины из 20 мг муки (n=4 повторности) экстрагировали, алкилировали, расщепляли трипсином и анализировали методом MRM-МС, как описано выше. Данные, отображенные на фиг. 8, показывают среднюю площадь пика для каждого пептида (сумма трех MRM-переходов) из каждой половины зерна ULG3.1 и линий, возникших от двойного перекрестного скрещивания исходных линий, обозначенных 043-2-148-2. Эти данные отображены по сравнению с контрольным ячменем (сорта дикого типа Sloop, Baudin, Commander и Hindmarsh) и трижды нулевой линией T2-4-8. Площадь пика показана для избранного прототипного пептида, представителя каждого семейства хордеинов, номер доступа в базе данных Uniprot и аминокислотные последовательности следующие:

A-F2EGD5_QQCCQPLAQISEQAR (SEQ ID NO: 52; из F2EGD5, центральный в авениноподобном А-белке);

B1-Q40020_VFLQQQCSPVR (SEQ ID NO: 53; близкий к N-концу В1-хордеина);

B3-Q4G3S1_VFLQQQCSPVMPQR (SEQ ID NO: 54);

C-Q40055_QLNPSHQELQSPQQPFLK (SEQ ID NO: 55; близкий к N-концу С-хордеина);

D-Q84LE9_ELQESSLEACR (SEQ ID NO: 56; из Q84LE9, перед стоп-кодоном на Y150);

G1-P17990_APFVGVVTGVGGQ (SEQ ID NO: 57; из P17990, С-концевой пептид) и

G3-P80198_QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 58; из P80198, центральный в γ3-хордеине).

Содержание D-хордеина в зернах двойного перекрестного скрещивания исходных линий, показанных на фиг. 8, было сходным с содержанием в зерне из ULG2.0 и в трижды нулевых по хордеинам линиях T2-4-8 и T2-6-A5, около нуля, что подтверждает наблюдение, сделанное при использовании 2D-ПААГ-электрофореза, когда D-хордеины не обнаружили в зерне линий T2-4-8 и T2-6-A5. Содержание гамма-1-хордеина в этом зерне дважды перекрестно скрещенных исходных линий было сходным с содержанием в ULG2.0 и в трижды нулевых по хордеинам линиях T2-4-8 и T2-6-A5. Несколько линий ULG3.2 обладали близким к нулевому содержанию пептида APFVGVVTGVGGQ (SEQ ID NO: 59). Гамма-1-хордеин не обнаруживался методом 2D-ПААГ-электрофореза линий T2-4-8 и T2-6-A5. Содержание гамма-3-хордеина в зернах двойного перекрестного скрещивания исходных линий было также сходным с содержанием в ULG2.0 и в трижды нулевых по хордеинам линиях, за исключением линии 124.1 (ULG3.2), в которой оно было очень низким. Гамма-3-хордеин также обнаруживался с уменьшенным содержанием методом 2D-ПААГ-электрофореза линий T2-4-8 и T2-6-A5.

Интересно, что выявлено синергическое действие мутаций Hor2 и Lys3a в отношении уменьшения содержания D-хордеинов в ULG2.0, несмотря на то, что отсутствовала мутация Hor3 (D-хордеин). Сходным образом наличие всех трех мутаций (Hor2-Lys3a-Hor3) имело синергическое действие в отношении снижения накопления гамма-1- и гамма-2-хордеинов, как определено по содержанию пептидов выше.

Пример 10. Создание лишенных оболочек трижды нулевых мутантов ячменя.

Все зерна ячменя селекционных вариантов ULG3.0, ULG3.1 и ULG3.2 были с оболочками, что яв-

ляется преимуществом для пивоваренной промышленности, поскольку отработанная шелуха образует фильтрующий слой во время финальных стадий фильтрации сусла (сцеживание). Однако оболочки зерен ячменя имеют большое количество мелких силикатных игл, и поэтому оболочки перед употреблением людьми необходимо удалять шелушением. Альтернативный подход заключается в получении лишенной оболочек зерна генетическими способами. Исходя из этого, растения ULG3.0 скрещивали с лишенной оболочек разновидностью ячменя, обозначенной Barleymax II (WO 2011/011833) и выбранным лишенным оболочки трижды нулевым по В-, С-, D-хордеинам мутантным (Hor2-Lys3a-Hor3) растением, которое было линией дикого типа по гену SSIIa.

Несколько трижды нулевых по хордеинам лишенных оболочек селекционных вариантов F6 (например, A7_1), содержащих менее 0,1 м.д. общего количества хордеина в муке, выбрали после трех циклов получения поколения одного семени.

Пример 11. Мутагенез ячменя.

Для выделения мутантов по выбранным генам в ячмене проводили мутагенез с этилметансульфонатом (ЭМС), описанный автором Caldwell (2004). Приблизительно 45000 (1,5 кг) семян ULG3.0 использовали для мутагенеза следующим образом: зерно замачивали в 2,5 л дистиллированной воды в течение 4 ч при комнатной температуре с аэрацией. Воду меняли каждый час во время замачивания. Потом семена инкубировали в 2,5 л свежеприготовленного 30 мМ ЭМС в 0,1 М фосфатном буферном растворе (pH7) в течение 16 ч при комнатной температуре с аэрацией. Потом семена промывали 2,5 л 100 мМ раствором тиосульфата натрия в течение 10 мин при комнатной температуре. Промывание тиосульфатом повторяли и потом зерна тщательно ополаскивали 2×2 л дистиллированной воды в течение 30 мин при комнатной температуре с аэрацией. Семена высушивали под потоком воздуха в течение ночи на абсорбентной фильтровальной бумаге перед высаживанием на следующий день в полевые условия. Основную массу семян M2 собирали, объединяли и анализировали на наличие мутантов. После такой обработки мутационная частота составила приблизительно 1 мутант в представляющем интерес гене на 1000 семян. Семени подвергали скринингу на потерю экспрессии гамма-3 хордеина методом дот-блоттинга для половин семян с использованием специфического моноклонального антитела к гамма-3 хордеину, из нескольких десятков тысяч семян M2 идентифицировали 40 семян, которые дали отрицательный сигнал. Отсутствие гамма-3 хордеина в этих зернах подтвердили методом Вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела и масс-спектрометрией на специфический пептид (SEQ ID NO: 58). Половины зерен, содержавшие эмбрион из каждого отрицательного зерна, поместили на среду для обеспечения прорастания. Эмбрионы большинства половин зерен не проросли, но несколько проросли.

Пример 12. Производство пива из ячменя с низким содержанием хордеинов.

Испытания по варке пива выполняли с использованием солода, полученного из зерна ULG2.0 стандартными методиками, и результаты сравнивали с контрольным сортом ячменя дикого типа Gairdner. Gairdner представляет собой высокоурожайную полукарликовую 2-рядную разновидность ячменя среднепозднего созревания, повсеместно выращиваемую во всех областях выращивания зерновых культур Австралии. При благоприятных условиях она производит надлежащий размер зерен, дающих умеренные уровни экстракции, ферментируемость и диастатическую активность, и поэтому представляет промышленный "стандарт", таким образом, она является идеальным для использования в качестве контроля для оценочных испытаний при варке пива. Солод, полученный из ULG2.0, обладал немного более высоким содержанием влаги, равным 5,7%, по сравнению с солодом из Gairdner (5,0%) и значительно отличавшимся от солода из Gairdner внешним видом, выраженным в том, что зерно выглядело выщербленным и сморщенным. Диастатическая активность (ДА) солода из ULG2.0 составляла 54WK, намного ниже, чем ДА для Gairdner 299WK. Осоложенный ячмень в большинстве случаев обладал ДА по меньшей мере 250KW. Тем не менее, солод из ULG2.0 был отрицательным по крахмалу через 20 мин длительности затирания и достиг результата по LG, равного 1,7° Плато.

Солод перемалывали за два прохода через 2-роллерную мельницу и достигали удовлетворительной степени дробления зерна. Для этого солода лучше всего бы подошло более комплексное перемалывание в шестироллерной мельнице из-за морфологии его зерна. В альтернативном варианте для отделения сусла удобнее было бы использовать молотковую мельницу в сочетании с фильтром для затора, чем фильтрационный чан. Измельченный продукт затирали стандартными способами при начальной температуре 65°C в течение 20 мин, потом 74°C в течение 5 мин с добавлением дополнительной промывной воды. В общем, морщинистая морфология солода из ULG2.0 создала сложность для удовлетворительного измельчения и затирания по сравнению с обычным солодом. Затертые продукты потом фильтровали, при этом морщинистая морфология ULG2.0 снова вызывала осложнения. Фильтрующий слой развалился на части с образованием каналов, поэтому потребовалось остановить стекание и повторно разрыхлить фильтрующий слой. Из-за неэффективного измельчения во время процесса фильтрования значительное количество потенциального экстракта было потеряно, что сказалось на достижении общего значения в котле 10,96° и 11,12° Плато, тогда как целью было достигнуть значения 14° Плато. Значения pH, цветности по ЕВС и уровня бета-глюкана были приемлемыми. Недостаточность измельчения также означала, что не произошло эффективное образование слоя шелухи, действующего как фильтрующий материал, что вызвало снижение качества ожидавшегося экстракта. Прозрачность фильтрата сначала была очень

мутной из-за плохого образования слоя, хотя прозрачность сусла улучшилась до приемлемой после получения 30 л фильтрата.

Результирующее сусло ферментировали дрожжевым штаммом *Saccharomyces uvarum* A при 18,5°C в течение 120 ч. Профиль ферментации был нормальным, отсутствовала продолжительная лаг-фаза в начале ферментации, хотя значительные уровни диацетила оставались даже после заданной продолжительной диацетильной фазы отдыха, после завершения ферментации была достигнута необходимая плотность. Диацетильная пауза, при которой пиво оставляют при повышенных температурах ферментации перед охлаждением пива до 0°C, проводится для того, чтобы позволить дрожжам реабсорбировать и метаболизировать диацетил. В большинстве случаев в конце ферментации требуется 24 ч, чтобы дать дрожжам время для разрушения этого продукта. Этого не произошло при двух пробных варках пива из ULG2.0. Изомеризованный экстракт хмеля добавляли в концентрации 30 мг/л и жидкость очищали добавлением силикатного гидрогеля. Готовое осветленное пиво имело более низкую физическую стабильность, чем контрольное пиво. Начальное помутнение при охлаждении считалось высоким, а помутнение при принудительном охлаждении вышло за пределы нормальной спецификации. Тем не менее, помутнение при охлаждении не привело к образованию взвешенных частиц.

Готовое пиво подвергли органолептическому анализу группой обученных пивоваров и, несмотря на сложности в процессах измельчения и фильтрования, результаты получились неожиданно хорошими, принимая во внимание вопросы, связанные с эффективностью сбраживания данного солода. ДМС (диметилсульфид) был преобладающим во вкусе и аромате; однако это не выглядело объективным. Наличие ДМС часто считается дефектом вкуса и аромата в австралийском пиве, но в большинстве случаев является общепринятым в европейских, особенно немецких сортах пива. Комментарии пивоваров были такими, что виды пива из ULG2.0 не были слишком непохожими на контрольные виды пива и что они были очень приемлемыми в качестве пива и напоминали немецкие сорта пива. Не было выраженных "зернистых" или "зерновых" типов вкусов и ароматов и не было жгучести и вяжущего вкуса для пива из ULG2.0, как обычно происходит для коммерческих видов пива, продвигаемых на рынке как "безглютеновые". Общий вкусовой и ароматический букет был приемлемым и достаточно хорошим.

Из зерна ячменя ULG3.0 таким же способом, как для зерна ULG2.0, было приготовлено пиво, а также оно было приготовлено из зерна ячменя ULG3.2. Ослаживание зерна ULG3.0 было лучшим относительно зерна ULG3.0, главным образом благодаря этапу измельчения, улучшенному из-за того, что зерно было менее морщинистым. Пиво, приготовленное из зерна ULG3.0, имело хорошее качество с приемлемым и достаточно хорошим вкусом и ароматом. Улучшенная морфология зерна (размер и форма) зерна из ULG3.2 предполагает более легкое измельчение и фильтрование в процессе варки пива, обеспечивая получения пива с общим содержанием хордеинов менее 1 м.д.

Пример 13. Производство пищевых продуктов с использованием ячменя ULG.

С использованием линий ячменя ULG3.0 и ULG3.2 выпекали два малоформатных хлеба (10 г). Малоформатные буханки выпекали с целью испытания, но данный способ может легко быть масштабирован до коммерческих объемов. Один хлеб готовили со 100% содержанием ячменной муки из ULG в качестве мучного ингредиента, перемолотого, как описано выше, тогда как второй хлеб готовили из смеси 30% муки и 70% коммерческой безглютеновой муки, такой как рисовая мука, в качестве мучного ингредиента. Муку (13,02 г) и другие ингредиенты замешивали в тесто для определения времени пикового тестообразования в миксографе 35-g. Использованный рецепт, основанный в каждом случае на 13,02 г муки, такой: мука 100%, соль 2%, сухие дрожжи 1,5%, растительное масло 2% и улучшитель 1,5%. Уровень добавления воды основан на величинах абсорбции воды для микромешалки с месильным органом Z-образной формы, который может корректироваться при получении полного рецепта. Формовка и укладка выполнялась в двухстадийные этапы с проверкой при 40°C и влажностью в помещении 85%. Выпекание проходило в печи Rotel в течение 14 мин при 190°C.

Оба хлеба имели содержание глютена менее 20 м.д. и были пригодными для употребления людьми, субъектами с ЦД.

Специалистам в этой области следует понимать, что для этого изобретения могут быть созданы многочисленные вариации и/или модификации, как показано в специальных вариантах реализации изобретения, без отступления от существа и объема данного изобретения, как было расширенно описано. Следовательно, данные варианты реализации изобретения должны рассматриваться во всех отношениях как иллюстративные и неограничивающие.

В данной заявке заявлен приоритет по заявке AU 2013902140, поданной 13 июня 2013 г., и AU 2013902565, поданной 11 июля 2013 г., полное содержание обоих заявок включено в данный документ посредством ссылки.

Все публикации, обсуждаемые и/или упоминаемые в данном документе, включены в данный документ в полном объеме.

Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или тому подобного, которое было включено в данное описание, сделано исключительно с целью обеспечения контекста данного изобретения. Не следует принимать в качестве допущения, что любое или все из этих положений не образуют часть предшествующего уровня техники или не составляли обычный известный уровень техники в

сфере, относящейся к данному изобретению, как если бы они не существовали до приоритетной даты каждого пункта формулы изобретения этой заявки.

Ссылки

- Abdullah et al. (1986) *Biotechnology* 4:1087.
- Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15: 251-258.
- Anderson et al. (2000) *Nature Medicine* 6:337-342.
- Anderson et al. (2013) *Genome* 56:179-185.
- Bibikova et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 289-287.
- Bibikova et al. (2002) *Genetics* 161:1169-1175.
- Bourque (1995) *Plant Sci.* 105: 125-149.
- Brandt et al. (1990) *Eur J Biochem* 194:499-505.
- Brennan et al. (1998) *J Cereal Sci.* 28:291–299.
- Caldwell (2004) *The Plant Journal* 40:143–150.
- Cameron-Mills et al., (1998). *Plant Mol Biol* 11: 449-461.
- Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.
- Catassi et al. (1994) *Lancet* 343:200-203.
- Certo et al. (2012) *Nat Methods* 8:941-943.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.
- Colgrave et al., (2012) *J. Proteome Res.* 11: 386-396.
- Comai et al. (2004) *Plant J* 37: 778-786.
- Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- Davies et al. (1993) *Cell Biology International Reports* 17:195–202.
- De Anglis et al. (2007) *J Food Protection* 70:135-144.
- Doll (1983) Barley seed proteins and possibilities for their improvement. В «Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritional Value», Gottschalk W, Muller HP (eds). Martinus Nijhoff, The Hague:207-223.
- Doll et al (1973) *Barley Genetics Newsletter* 3:12-13.
- Dostalek et al. (2006). *Food Additives and Contaminants* 23:1074-1078.
- Doyon et al. (2010) *Nat. Methods* 7:459-460.
- Doyon et al. (2011) *Nat. Methods* 8:74-79.
- Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- Fasoli et al., (2010). *J. Proteome Res.* 9: 5262-6269.
- Field et al. (1982) *Theoretical and Applied Genetics* 62:329–336.
- Fowell et al. (2006) *Qjm-an International Journal of Medicine* 99:453-460.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2:74.
- Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Green (2009) *Journal of the American Medical Association* 302:1225-1226.
- Green and Jabri (2006) *Annual Review of Medicine* 57:207-221.
- Groenen et al. (1993) *Mol. Microbiol.* 10:1057-1065.

- Gu et al. (2003) *Genome* 46:1084-1097.
- Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 400:96-107
- Haft et al. (2005) *Computational Biology* 1(6):e60
- Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- Hausch et al. (2002) *Gastroenterology* 122:A180.
- Henikoff et al. (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Hoe et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.* 5:254-263.
- Ishino et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:5429-5433.
- Janssen et al. (2002) *OMICS J. Integ. Biol.* 6:23-33.
- Jaradat (1991) *Theor Appl Genet* 83:164-168.
- Kahlenberg et al. (2006) *European Food Research Technology.* 222:78-82.
- Kasarda et al. (1984) *PNAS* 81:4712-4716.
- Kikuchi et al., (2003). *Theor Appl Genetics* 108: 73-78.
- Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1156-1160
- Kim et al. (2012) *Genome Res.* 22:1327-1333.
- Kozziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- Kreis and Shewry (1989) *BioEssays* 10:201-207.
- Kreis et al. (1983) *Cell*: 34:161-167.
- Kristoffersen et al., (2000) *Electrophoresis* 21: 3693-3700.
- Kupper (2005) *Gastroenterology* 128:S121-127.
- Lanzini et al. (2009) *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29:1299-1308.
- Lee et al. (2007). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 20:423-430.
- Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- Marti et al. (2005) *J Pharmacol Exp Therapeut* 312:19-26.
- Masepohl et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30.
- McConnell Smith et al. (2009) *PNAS* 106:5099-5104.
- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785.
- Mojica et al. (1995) *Mol. Microbiol.* 17:85-93.
- Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.* 36:244-246.
- Moravcova et al. (2009). *Journal of Chromatography a* 1216:3629-3636.
- Nakata et al. (1989) *J. Bacteriol.* 171:3553-3556.
- Ohlund et al. (2010). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 23:294-300.
- Pasquinelli et al. (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Perriman et al. (1992) *Gene* 113: 157-163.
- Picariello et al. (2011). *Food Chemistry* 124:1718-1726.
- Ramirez et al. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40:5560-5568.
- Rubio-Tapia et al. (2010). *American Journal of Gastroenterology* 105:1412-1420.
- Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15: 79-119.
- Shan et al. (2002). *Science* 297:2275-2279.

- Shewry (1995) *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70:375-426.
- Shewry and Halford (2002) *Journal of Experimental Botany* 53:947-958.
- Shewry and Tatham (1990) *Biochemical Journal* 267:1-12.
- Shewry, et al., (1999) The prolamins of the Triticeae. In *Seed Proteins*, Kluwer: London, 1999; pp 35-78.
- Shippy et al. (1999) *Mol. Biotech.* 12: 117-129.
- Skovbjerg et al. (2005) *Diabetologia* 48:1416-1417.
- Skovbjerg et al., (2004). *Biochim. et Biophys. Acta - Mol. Bas. of Dis.* 1690:220-230.
- Slade and Knauf (2005) *Transgenic Res* 14: 109-115.
- Smith et al. (2000) *Nature* 407: 319-320.
- Stepniak et al. (2006) *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 291:621-629.
- Szczeppek et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:786-793.
- Tanner et al. (2013) *Plos One*: 8:e56456.
- Tanner et al., (2010). *Aliment Pharmacol Ther.* 32: 1184-1191.
- Tjon et al. (2010) *Immunogenetics* 62:641-651.
- Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- Tye-Din et al. (2010) *Science Translational Medicine* 2:41-51.
- van Embden et al. (2000) *J. Bacteriol.* 182:2393-2401.
- Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103.
- Wang et al. (2012) *Genome Res.* 22:1316-1326.
- Waterhouse et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964.
- Wijngaard and Arendt (2007) *Brewer & Distiller International* 3: 31-32.
- Wild et al. (2010). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 32:573-581.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Зерно ячменя, которое содержит около 50 м.д. или менее общих хордеинов, где зерно является гомозиготным по аллели локуса *Hor2*, причем большинство или все гены, кодирующие В-хордеины, были удалены, зерно является гомозиготным по нулевой аллели гена, кодирующего D-хордеин в локусе *Hor3*, и зерно является гомозиготным по аллелю в локусе *Lys3*, что приводит к отсутствию в зерне С-хордеинов.
2. Зерно по п.1, содержащее около 20 м.д. или менее, около 10 м.д. или менее, около 5 м.д. или менее, от около 0,05 до около 50 м.д. или от около 0,05 до около 20 м.д., от около 0,05 до около 10 м.д., от около 0,05 до около 5 м.д., от около 0,1 до около 5 м.д., около 3,9 м.д. или около 1,5 м.д. общих хордеинов.
3. Зерно по п.1 или 2, где средняя масса зерновки составляет по меньшей мере около 35 мг, по меньшей мере около 39 мг, по меньшей мере около 41 мг, по меньшей мере около 47 мг, от около 35 до около 60 мг, от около 40 до около 60 мг, от около 45 до около 60 мг, около 39,1 мг, около 41,8 мг или около 47,2 мг.
4. Зерно по любому из пп.1-3, которое получено из растения, обладающего уборочным индексом по меньшей мере 40%, от около 40 до около 60%, от около 40 до около 55% или от около 40 до около 50%.
5. Зерно по любому из пп.1-4, обладающее соотношением длины к толщине менее чем около 5, менее чем около 4, менее чем около 3,8, от около 2 до около 5 или от около 2,5 до около 3,8.
6. Зерно по любому из пп.1-5, где концентрация В-хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54, дополнительно снижена до менее 10%, менее 5% или менее 2% относительно концентрации в ячменном зерне дикого типа или где зерно не содержит В-хордеинов.
7. Зерно по п.6, где концентрация γ -хордеинов, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 57, и/или авениноподобных А-белков, содержащих последовательность аминокислот, представленную как SEQ ID NO: 52, составляет менее 10%, менее 5% или менее 2% относительно концентрации в ячменном зерне дикого типа или где зерно не содержит γ -хордеинов и/или авениноподобных А-белков.
8. Зерно по любому из пп.1-7, где:
 - i) ген, который кодирует D-хордеин, содержит преждевременный стоп-кодон, мутацию сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки, инсерцию или делецию или
 - ii) большинство или все кодирующие D-хордеины гены удалены.
9. Зерно по п.8, содержащее ген, кодирующий усеченный D-хордеин, который имеет стоп-кодон в триплете, кодирующем аминокислоту номер 150 последовательности SEQ ID NO: 56.

10. Зерно по любому из пп.1-9, содержащее около 1% или менее, около 0,01% или менее, около 0,007% или менее, около 0,0027% или менее, от около 0,001 до около 1%, от около 0,001 до около 0,01%, около 0,007% или около 0,0027% концентрации общих хордеинов по сравнению с зерном из соответствующего растения ячменя дикого типа.

11. Зерно по п.10, полученное из растения, которое обладает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, от около 60 до 100%, от около 70 до 100%, от около 80 до 100%, около 60%, около 70%, около 80% или около 90% урожайности зерна растения ячменя дикого типа.

12. Зерно по п.10 или 11, где средняя масса зерновки составляет по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95 или около 100% зерновки растения ячменя дикого типа.

13. Зерно по любому из пп.1-12, где целиакальная токсичность муки, полученной из данного зерна, составляет менее чем около 5% или менее чем около 1% относительно муки, полученной из зерна соответствующего растения ячменя дикого типа.

14. Зерно по любому из пп.1-13, полученное от нетрансгенного растения.

15. Зерно любому из пп.1-14, где по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, от около 80 до около 98% или от около 80 до около 93% от массы зерна не проходит через сито с размером ячеек 2,8 мм.

16. Растение ячменя, которое производит зерно в соответствии с любым из пп.1-15.

17. Способ получения пищевого ингредиента или ингредиента напитка на основе солода, или пищевого продукта, или напитка на основе солода, причем способ включает переработку зерна по любому из пп.1-15, для получения солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы, причем зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 50 м.д. или менее общих хордеинов, тем самым получая пищевой ингредиент или ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или напиток на основе солода.

18. Способ получения пищевого ингредиента или ингредиента напитка на основе солода, или пищевого продукта или напитка на основе солода, причем способ включает смешивание зерна по любому из пп.1-15 или солода, сусла, муки или цельнозерновой крупы, полученных из указанного зерна, по меньшей мере с одним другим пищевым ингредиентом или ингредиентом напитка, причем зерно, солод, сусло, мука или цельнозерновая крупа содержат около 50 м.д. или менее общих хордеинов, тем самым получая пищевой ингредиент или ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или напиток на основе солода.

19. Способ по п.17 или 18, который включает получение из зерна муки или цельнозерновой крупы.

20. Способ по п.17 или 18, который включает получение солода из зерна.

21. Способ по п.20, который дополнительно включает фракционирование высушенного пророщенного зерна на две и более фракции эндосперма, фракции эндотелиального слоя, фракции шелухи, фракции проростков и фракции солодовых ростков, и соединение и смешивание предопределенных количеств двух или более из этих фракций.

22. Способ по любому из пп.17-19, где пищевой ингредиент представляет собой муку или крахмал.

23. Способ по любому из пп.17-19, где пищевой продукт представляет собой хлебопродукты на закваске или без закваски, макаронные изделия, лапшу, сухие завтраки, снеки, коржи, кондитерские изделия или продукты, содержащие соусы на основе муки.

24. Способ по любому из пп.17, 18, 20 или 21, где ингредиент напитка на основе солода представляет собой солод или сусло.

25. Способ по любому из пп.17, 18, 20 или 21, где напиток на основе солода представляет собой пиво или виски.

26. Способ получения зерна ячменя, причем способ включает:

а) выращивание растения ячменя по п.16 и

б) сбор зерна.

27. Способ по п.26, который включает выращивание по меньшей мере 10000 растений в полевых условиях на площади по меньшей мере 1 га.

28. Способ получения муки, цельнозерновой крупы, крахмала, солода или сусла, причем способ включает:

а) получение зерна по любому из пп.1-15 и

б) переработку зерна для получения муки, цельнозерновой крупы, крахмала, солода или сусла, где переработка зерна включает измельчение, осоложивание и/или ферментацию.

29. Продукт, полученный из растения ячменя по п.16 или зерна по любому из пп.1-15, где продукт представляет собой пищевой ингредиент, ингредиент напитка на основе солода, пищевой продукт или напиток на основе солода.

30. Продукт по п.29, где напиток на основе солода представляет собой пиво или виски.

31. Пищевой продукт из зерна, получаемый с использованием способа по любому из пп.17-19 или п.22, где продукт содержит ДНК из зерна, где ДНК содержит

аллель локуса *Hor2*, где большинство или все гены, кодирующие В-хордеин, были удалены,

нулевой аллель гена, кодирующего D-хордеин в локусе *Hor3*, и аллель в локусе *Lys3*, в результате чего в зерне отсутствуют С-хордеины.

32. Пиво, полученное из зерна по любому из пп.1-15, где пиво содержит менее 0,9 м.д. общих хордеинов.

33. Пиво по п.32, которое содержит по меньшей мере 2% этанола.

34. Мука или цельнозерновая крупа, полученная из зерна по любому из пп.1-15, где мука содержит менее чем около 10 м.д. или менее чем около 5м.д. общих хордеинов.

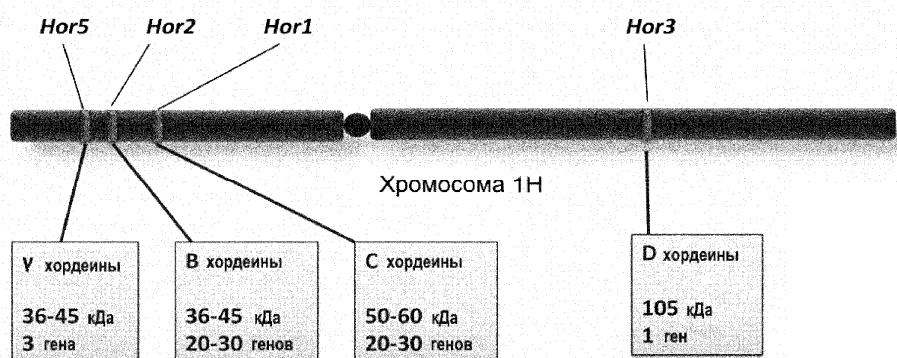
35. Мука по п.34, где мука представляет собой цельнозерновую крупу.

36. Солод или сусло, полученное из зерна по любому из пп.1-15, где солод или сусло содержат менее чем около 50 м.д. или менее чем около 20 м.д. общих хордеинов.

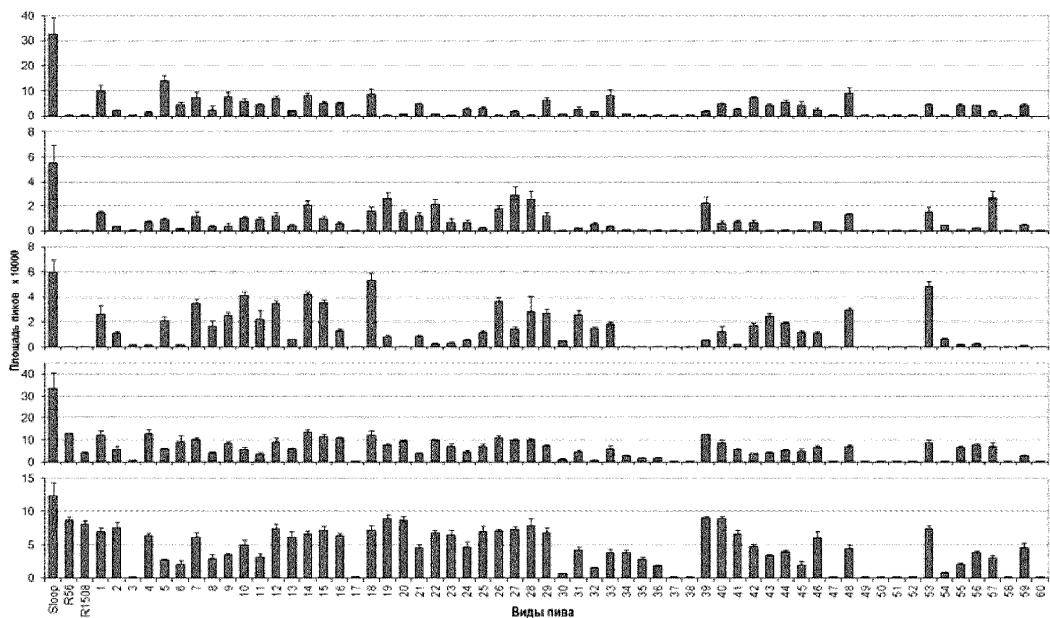
37. Солод или сусло по п.36, содержащие менее чем около 20 м.д. общих хордеинов.

38. Применение пищевого продукта или напитка на основе солода по любому из пп.29-33 для предотвращения или уменьшения частоты возникновения или тяжести заболевания целиакией.

39. Применение зерна по любому из пп.1-15 для производства пищевого продукта или напитка для перорального введения субъекту для предотвращения или уменьшения частоты возникновения или тяжести заболевания целиакией.



Фиг. 1



Фиг. 2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нум con  MAKRLVLFVAVIVALVALTTAEREINGNNIFLDSRSRQLQCERELQESSLEACRRVVDQQLVGQLPWSGLQMCCQQLR
      90     100     110     120     130     140     150     160
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нум con  DVSP ECRPVALSQVVRQYEQQTEVP SKGGSFYPGGTAPFLQGGGWWGTSVKWYYPDQTSSQQSWGQGGYHQSVTSSQQP
      170     180     190     200     210     220     230     240
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      570     580     590     600     610     620     630     640
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      650     660     670     680     690     700     710     720
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      730     740     750
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
LKVAKAQQQLAAQLPAMCRLEGGGGLLASQ*

```

Фиг. 3

```

      10      20      30      40      50      60      70
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      80      90     100     110     120     130     140
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      150     160     170     180     190     200     210
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      220     230     240     250     260     270     280
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  ....C.....A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      290     300     310     320     330     340     350
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      360     370     380     390     400     410     420
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                           M A K R L V L F
D-нул con  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                           M A K R L V L F
      430     440     450     460     470     480     490
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  V A V I V A L V A L T T A E R E I N G N N I F
      V A V I V A L V A L T T A E P E I N G N N I F
      500     510     520     530     540     550     560
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CTTGATAGCCGCTCTAGGCAGCTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAGCTCGCTCGAGGGCGTGCCGGC
      L D S R S R Q L Q C E R E L Q E S S L E A C R R
      L D S R S G Q L Q C E R E L Q E S S L E A C R R
      570     580     590     600     610     620     630
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GGGTCGTGGACCAACAGCTGGTTGGCCAGCTGCCATGGAGCACGGGGCTCCAGATGCAGTGCTGCCAGCA
      V V D Q Q L V G Q L P W S T G L Q M Q C C Q Q
      V V D Q Q L V G Q L P W S T G L Q M Q C C Q Q
      640     650     660     670     680     690     700
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GCTTCGGGACGTACAGCCCGAGTGCCGCCCGCTCGCCCTCAGCCAGGTCGTGAGGCAATACGAGCAGCAA
      L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q
      L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q

```

5' D-нул маркер

```

      710      720      730      740      750      760      770
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  ACCGAGGTGCCATCCAAGGGAGGATCCTTCTACCCGGGCGGGACCGCACCGCGCTGCAGCAAGGAGGAT
            T E V P S K G G S F Y P G G T A P P L Q Q G G W
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            T E V P S K G G S F Y P G G T A P P L Q Q G G W

      780      790      800      810      820      830      840
Sloop con  GGTGGGAACCTCTGTAAATGGTACTACCCAGACCAACTTCTTCGCAACAGTCATGGCAAGGGCAACA
            W G T S V K W Y Y P D Q T S S Q Q S W Q G Q Q
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            W G T S V K W Y Y P D Q T S S Q Q S W Q G Q Q

      850      860      870      880      890      900      910
Sloop con  AGGGTACCACCAAGCGTAACTTCTTCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAAGGGTCCTACCCAGGTTC
            KpnI
            G Y H Q S V T S S Q Q P G Q G Q Q G S Y P G S
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            G *

      920      930      940      950      960      970      980
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  ACTTTCCTCCGAGCAGCCAGGACAAGGACAACACCAGGACAGAGGCAGCCATGGTCTATCCAAAGTGCAA
            3' D-нул marker
            T F P Q Q P G Q G Q Q P G Q R Q P W S Y P S A T
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CTTTCCCAACAGCCAGGGC-----AAGGGCAAGGGCAACAGGGTACTACCCAGGCGCAACTTCCCT
            F P Q Q P G Q G Q G Q Q G Y Y P G A T S L
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            AAGGGC

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GCTGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCCCTACCAGAGTGCAACTTCTCCACAGCAGCCAGGACAAGGA
            L Q P G Q G Q Q G P Y Q S A T S P Q Q P G Q G
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            A

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CAGGGACACCAAGAGACCTATCAATTTGCAACTTCCCGCATCAGCCAGGACAATGGCAACAACAGGAC
            Q G H Q E T Y Q F A T S P H Q P G Q W Q Q P G Q
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            A.....C.....C.A

      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  AAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAGTGTAATTCTCCACAACAGTCGGGACAAGGGCAACAGGGTACCC
            G Q Q G Y Y P S V T S P Q Q S G Q G Q T G Y P
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            CA

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  AAGTACAACTTCTCCACAACAATCGGGCAAGGGCAACAGCTGGGACAAGGGCAACAACAGGACAAGGG
            S T T S P Q Q S G Q G Q Q L G Q G Q Q P G Q G
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CAACAAGGGTACCCAAGTGCAACTTTTCCACAACAGCCAGGACAATGGCAACAAGGGTCCTACCCAAGTA
            Q Q G Y P S A T F P Q Q P G Q W Q Q G S Y P S T
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

```

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACAACCCAAGTGGAACTTCTACGCAGCAGCC
T S P Q Q S G Q G Q Q G Y N P S G T S T Q Q P
D-нул con .....

      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGACAAGTGCAACAGTTGGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAATTGCAACTTCTCCGCAGCAGCCA
G Q V Q Q L G Q G Q Q G Y Y P I A T S P Q Q P
D-нул con .....

      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGACAAGGGCAACAGCTAGGACAAGGGCAACACCAGGACATGGGCAACAGCTAGTGCAAGGGCAACAAC
G Q G Q Q L G Q G Q Q P G H G Q Q L V Q G Q Q Q
D-нул con .....

      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGGACAAGGGCAACAAGGACACTACCCAAGTATGACTTCTCCGCACCAACAGGACAAGGGCAAAAAGG
G Q G Q Q G H Y P S M T S P H Q T G Q G Q K G
D-нул con .....

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACTACCCAAGTGCAATTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGACAACAAGGATACCAGCCTAGTGGAGCT
Y Y P S A I S P Q Q S G Q G Q Q G Y Q P S G A
D-нул con .....

      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTCACAGGGTTCGGTGCAAGGGGCGTGCCAGCACAGCACATCTTCTCCGCAGCAGCAAGCACAAGGGT
S S Q G S V Q G A C Q H S T S S P Q Q Q A Q G C
D-нул con .....A.....

      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCAAGCTTCTTCACCAAGCAAGGGCTAGGGTCGTTGTACTACCCGAGTGGAGCTTATACACAACAGAA
Q A S S P K Q G L G S L Y Y P S G A Y T Q Q K
D-нул con .....

      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCAGGGCAAGGGTACAACCCAGGTGGAACTTCTCCGCTGCACCAGCAAGGGGGAGGGTTCCGGCGGCGGG
P G Q G Y N P G G T S P L H Q Q G G G F G G G
D-нул con .....

      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAACGACGGAGCAACCGCAGGGAGGAAAGCAGCCATTCCATTGCCAGCAAACCACTGTCTCCCTCACC
L T T E Q P Q G G K Q P F H C Q Q T T V S P H Q
D-нул con .....

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGGGTCAGCAAACCACTGTTTCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCA
G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q
D-нул con .....C.....

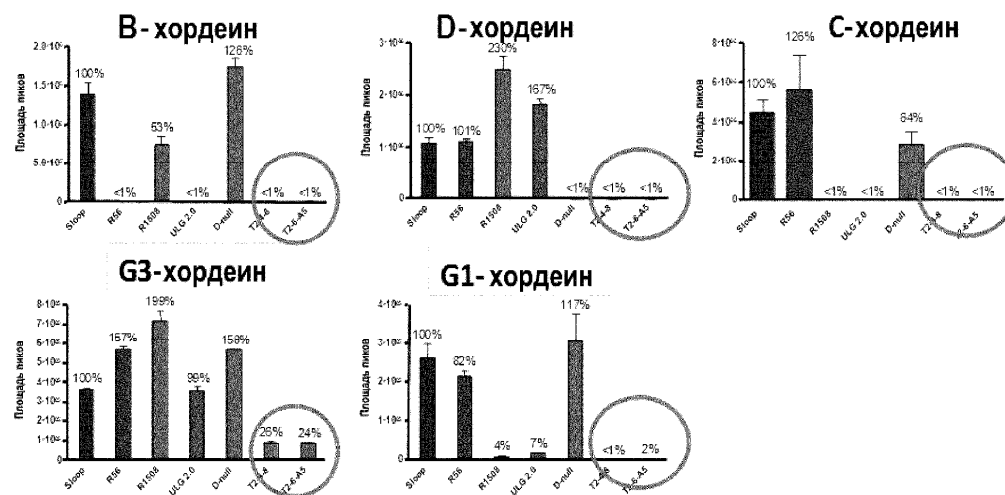
```

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  AACCAGTGTCTCCCTCACCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCTCACCAGGGTCAGCAAACCACCGTC
            T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V
-----
      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  TCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCAGTGTCTCCCTCATCCGGGTCAGCAAACCAGTGTCTCCCTCATC
            S P H Q G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q
-----
      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  AGGGTCAGCAAACCAGTGTCTCCCTCATCCGGGTCAGCAAACCAGTGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCA
            G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q G Q Q
-----
      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  AACCAGTGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTC
            T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V
            .....C.....
-----
      2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  TCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAGCCCGGCGAGCAGCCTTGGC
            S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q P G E Q P C G
            .....C.....
-----
      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GTTTCCTGGCCAGCAAACCACCGTGTCTCTGCACCATGGTCAGCAGTCCAACGAGTTGTACTACGGCAG
            F P G Q Q T T V S L H H G Q Q S N E L Y Y G S
-----
      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CCCATACCATGTTAGCGTGGAGCAGCCGTCGGCCAGCCTAAAGGTAGCAAAGGCGCAGCAGCTCGCGGCG
            P Y H V S V E Q P S A S L K V A K A Q Q L A A
            .....A
-----
      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  CAGCTGCCGGCAATGTGTCTGGCTGGAGGGCGGGCGGCCTGTTGGCCAGCCAGTAGTAGAACTCTGGCA
            Q L P A M C R L E G G G G L L A S Q *
-----
      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GCTCGCATGGTGCTTGGGCATGCATGCATCTTAGCTATACAATAAACGTGACGTGTGCTTGCACTTTTC
            .....C.....
-----
      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  ATGTAACTAGGGTAAACCAACAATAATGCAAAACGGAAAGCTTCTCCATCCAAAAAAGAACAAACT
            .....
-----
      2810      2820      2830      2840
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
D-нул con  GGTGCTATATAGTATGCGCTACATGTCTCAGCTCATTTGTCAG
            .....

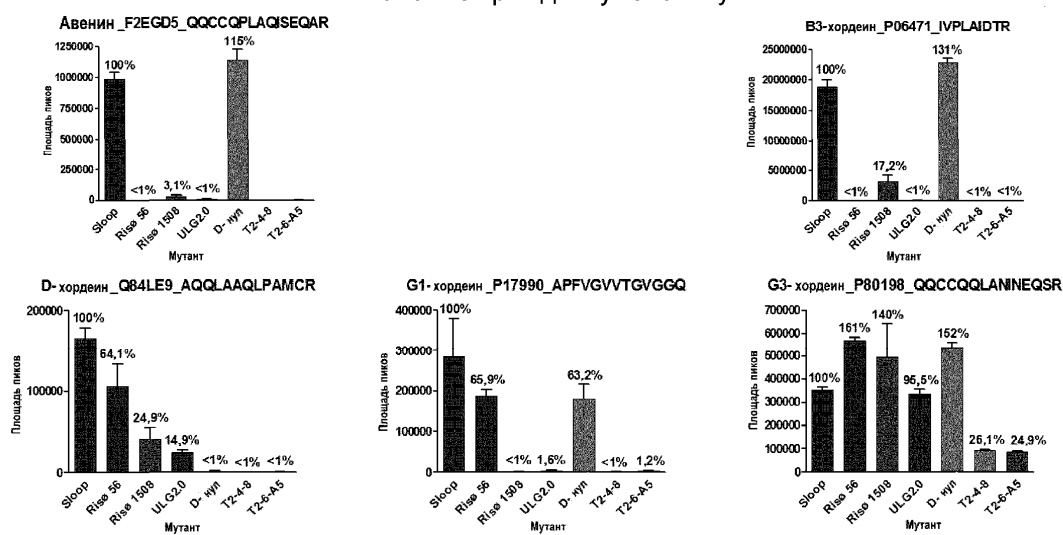
```

Фиг. 4



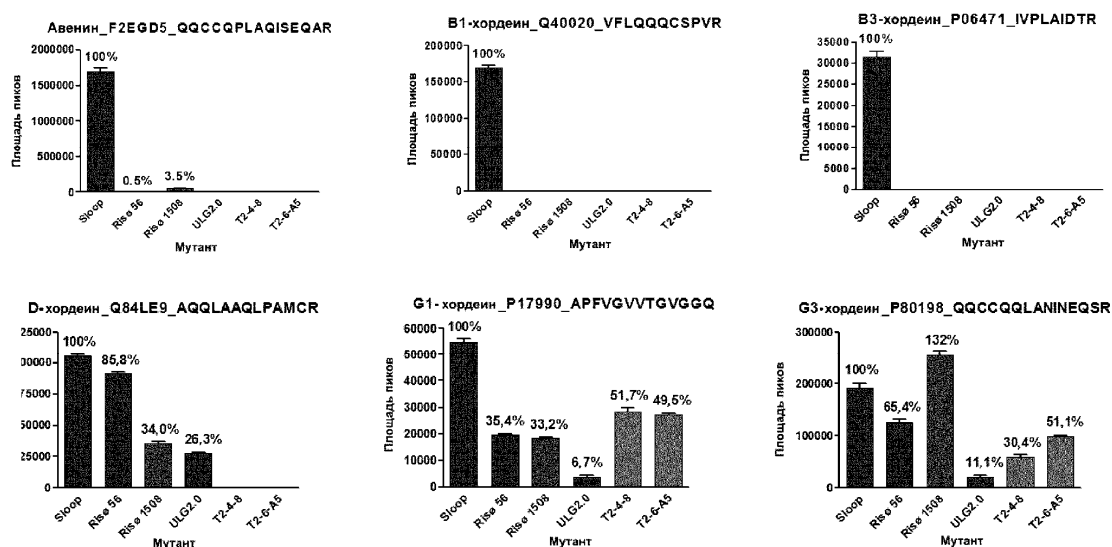
Фиг. 5

MRM-анализ трижды нулевой муки

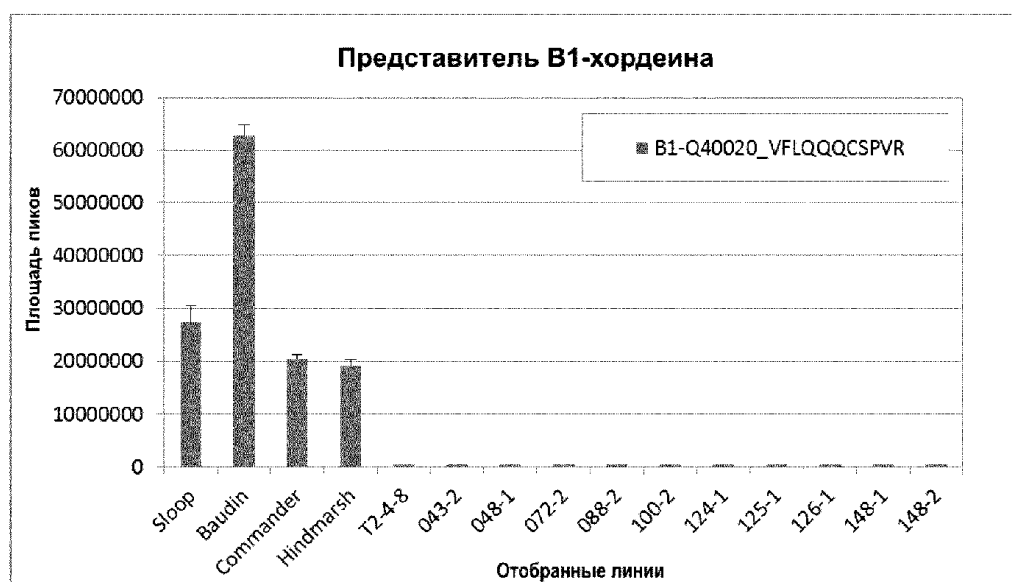


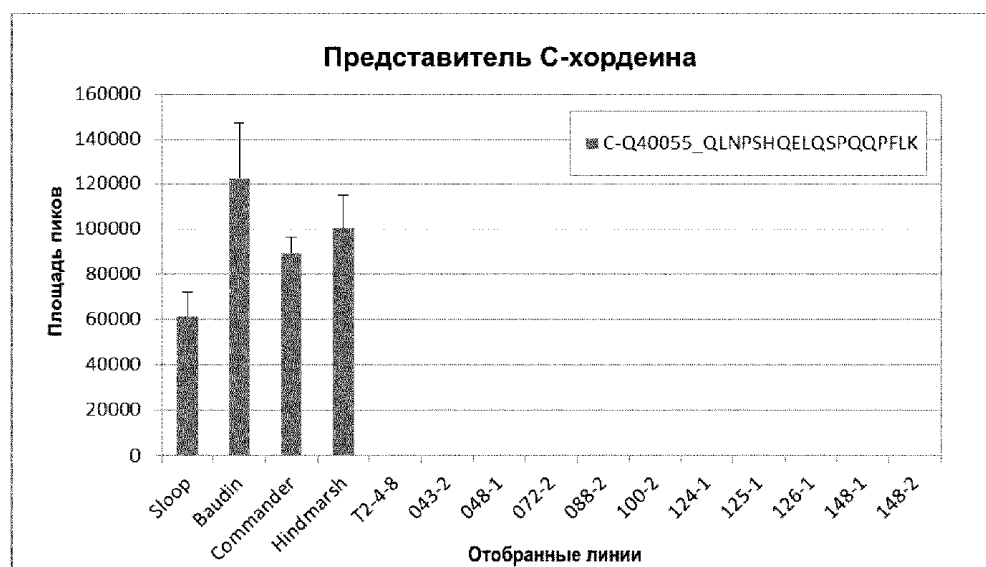
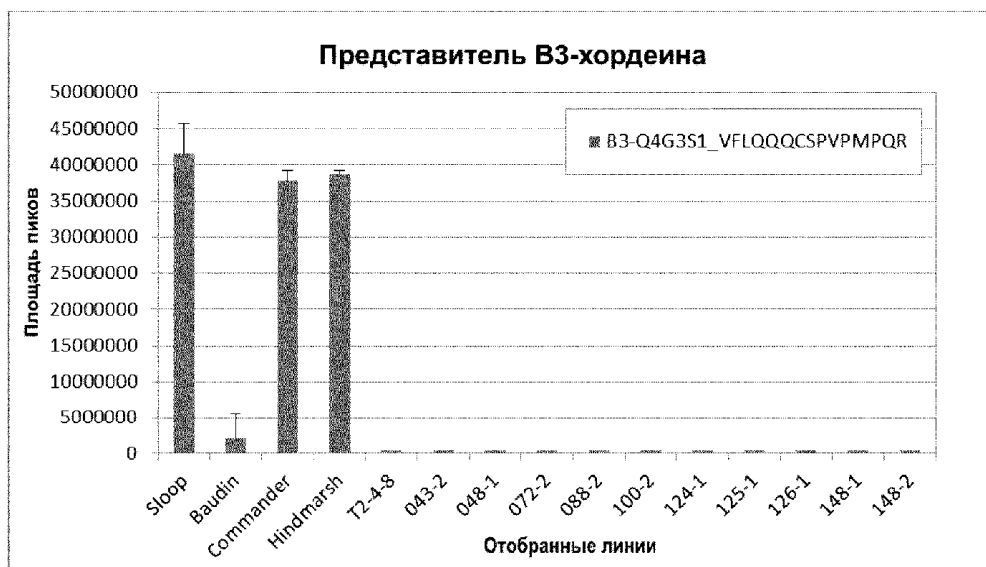
Фиг. 6

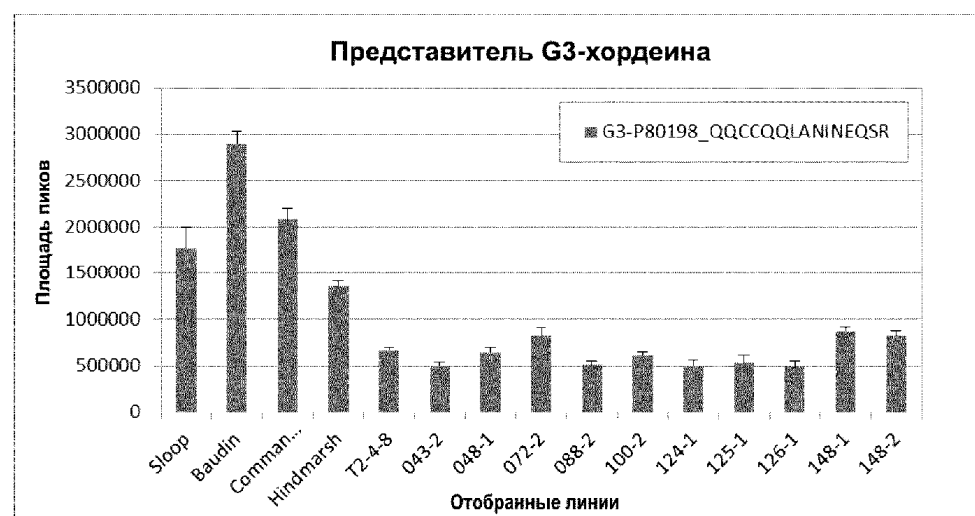
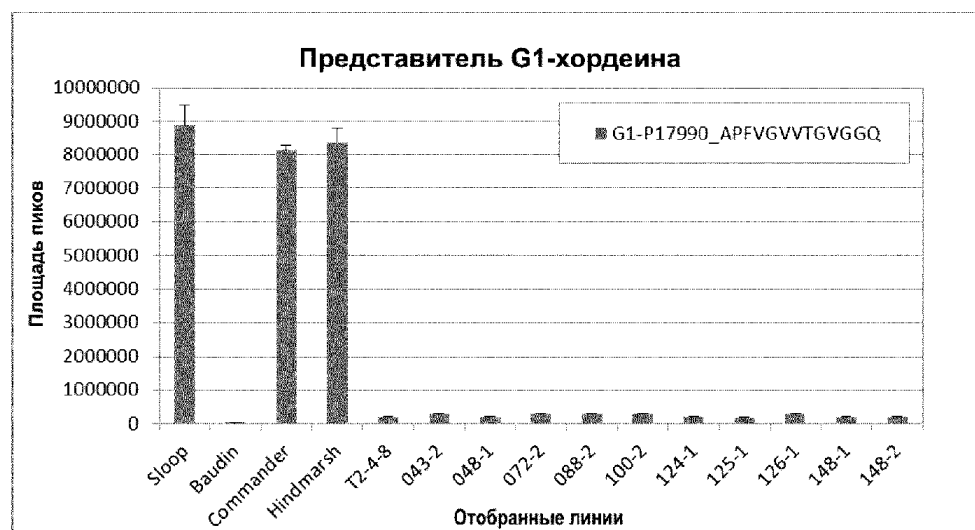
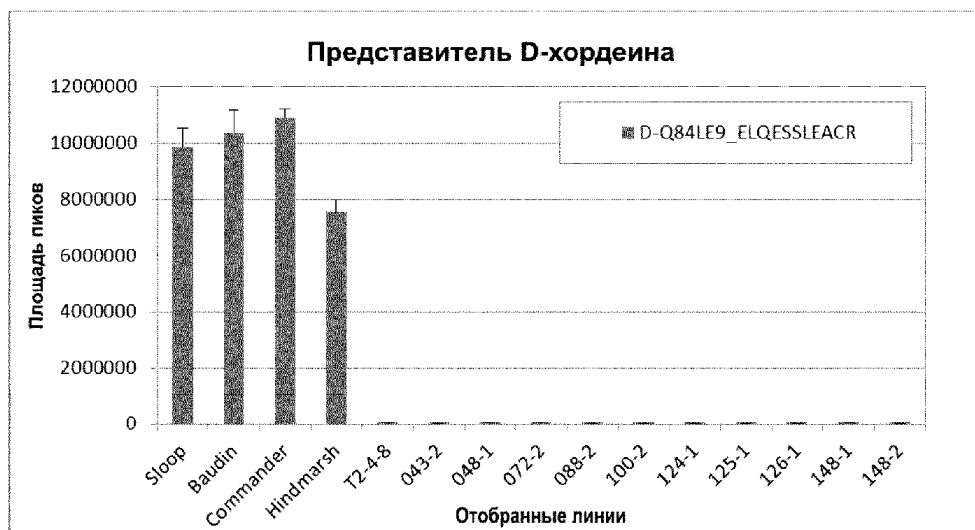
MRM-анализ трижды нулевых видов пива



Фиг. 7







Фиг. 8

