

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036403**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.06

(21) Номер заявки
201690634

(22) Дата подачи заявки
2014.09.24

(51) Int. Cl. **C12N 9/10** (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C08L 1/02 (2006.01)

(54) БЕЛОК С АКТИВНОСТЬЮ ЦЕЛЛЮЛОЗА:КСИЛОГЛЮКАН-ЭНДОТРАНСГЛЮКОЗИЛАЗЫ (СХЕ) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **13185727.8; 13192054.8**

(32) **2013.09.24; 2013.11.08**

(33) **EP**

(43) **2016.07.29**

(86) **PCT/EP2014/070381**

(87) **WO 2015/044209 2015.04.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАСФ СЕ (DE); ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ
КОРТ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ЭДИНБУРГ (GB)**

(72) Изобретатель:
**Мелеватер Франк, Ван Ден Бранде
Илсе (BE), Фрай Стефен К. (GB),
Молер Кайл И. (US), Франкова Ленка,
Симмонс Том Дж., Холланд Клэр,
Хадсон Эндрю (GB)**

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

(56) **WO-A1-2008011681**

MARIA HRMOVA ET AL.: "Substrate specificity and catalytic mechanism of a xyloglucan xyloglucosyl transferase HvXET6 from barley (*Hordeum vulgare* L.)", FEBS JOURNAL, vol. 276, no. 2, 8 December 2008 (2008-12-08), pages 437-456, XP055156818, ISSN: 1742-464X, DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06791.x, abstract; figure 3; table 2

STEPHEN C. FRY ET AL.: "Mixed-linkage beta-glucan:xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from *Equisetum* (horsetails) and charophytic algae", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 55, no. 2, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 240-252, XP002670000, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1111/J.1365-313X.2008.03504.X [retrieved on 2008-04-04] cited in the application, the whole document

DATABASE EMBL [Online] 30 January 2010 (2010-01-30), "Sequence 2125 from patent US 7635798", XP002733604, retrieved from EBI accession no. EM PAT:GV605969, Database accession no. GV605969, sequence & US 7635798 B2 (WEGLARZ THADDEUS [US] ET AL) 22 December 2009 (2009-12-22), sequence 2125

DATABASE EMBL [Online] 25 March 2006 (2006-03-25), "CHAY4908.b1_H04.ab1 CHA(XYZ) common wild sunflower *Helianthus annuus* cDNA clone CHAY4908, mRNA sequence", XP002733605, retrieved from EBI accession no. EM EST:DY921601, Database accession no. DY921601, sequence

(57) Изобретение относится к белку, имеющему активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (СХЕ); к нуклеиновой кислоте, кодирующей заявленный белок; к химерному гену, содержащему промотор, заявленную нуклеиновую кислоту и область терминирования транскрипции и полиаденилирования; к клетке-хозяину и трансгенному растению, содержащим заявленный химерный ген. Также изобретение относится к способу получения заявленного белка в заявленной клетке-хозяине; к способу получения заявленного трансгенного растения посредством встраивания заявленного химерного гена; к способу изменения свойств волокна в растении; к способам получения целлюлозного материала, пищевого, кормового или промышленного продукта.

B1**036403****036403****B1**

Настоящее изобретение относится к белкам гетеро-трансглюкозилазам (HTG), имеющим активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (CXE) в дополнение к активности бета-глюкан со смешанными связями:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (MXE). Белок может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8 или ее функционального фрагмента, или белок может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8, или к аминокислотам 22-280 в SEQ ID NO: 2, к аминокислотам 26-283 в SEQ ID NO: 6 или к аминокислотам 29-287 в SEQ ID NO: 8. Кроме того, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей белок, в соответствии с изобретением, химерному гену, содержащему, в том числе, заявленную нуклеиновую кислоту, клетке-хозяину, содержащей указанный химерный ген, и трансгенному растению, содержащему указанный химерный ген. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения трансгенного растения и способу изменения по меньшей мере одного свойства волокна в растении, продуцирующем волокна, или укрепления растения, как описано в формуле изобретения.

В настоящем описании процитирован ряд документов, включая патентные заявки и руководства производителей. Описание этих документов, хотя его и не считают важным для патентоспособности настоящего изобретения, включено, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме. Более конкретно, все упоминаемые документы включены в качестве ссылок в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и отдельно указан как включенный в качестве ссылки.

Структурная целостность наземных растений в значительной степени опосредована клеточными стенками, окружающими растительные клетки и ответственными за прочность и гибкость растений. Помимо этой функции, стенки растительных клеток также важны для межклеточных связей и межклеточной коммуникации. Пористость клеточных стенок делает возможным обмен воды и питательных веществ.

Первичные клеточные стенки сосудистых растений состоят из целлюлозных микрофибрилл, заключенных в химически сложный матрикс, состоящий из полисахаридов, таких как в основном ксилоглюканы и пектиновые полисахариды в двудольных и многих однодольных растениях или глюкуроноарабиноксиланы и (1,3;1,4)-бета-D-глюканы, в основном у трав и зерновых злаков. Хотя к настоящему времени выяснены типы и распространенность полисахаридов в стенках растительных клеток, лишь немного известно о молекулярных взаимодействиях между полисахаридами в клеточной стенке. Длительное время ответственными за удержание различных полисахаридов на месте считали обширные межмолекулярные водородные связи, а не ковалентные взаимодействия (Bacic et al., 1988; Somerville et al., 2004).

Предпосылки изобретения

Обнаружено, что ксилоглюканы являются важным фактором в морфогенезе клеточной стенки (обзор в Baumann et al., 2007) и способны образовывать водородные связи с целлюлозой, см. The Plant Journal, 1993, p. 1-30.

Трансглюкозилазы полисахаридов, также называемые трансглюканазами полисахаридов, катализируют реорганизацию молекул полисахаридов посредством расщепления гликозидных связей в полисахаридных цепях и переноса их расщепленных частей на гидроксильные группы на невосстанавливающих остатках молекул других полисахаридов или олигосахаридов (обзор в Frankova and Fry, 2013; включенный, таким образом, в качестве ссылки). Примерами трансглюкозилаз являются трансглюкозилазы (также называемые трансглюканазами), трансксилазы и трансманнаны. Из них ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (ХЕТ; также называемые ксилоглюкан-эндотрансглюканазами, или ХТН, или ксилоглюкан-ксилоглюкозилтрансферазами) меняют структуру ксилоглюкана в первичных и вторичных клеточных стенках наземных растений, включая Equisetum и печеночные мхи (Fry et al., 1992; Fry et al. 2008). В отличие от большинства других тестируемых наземных растений у Equisetum дополнительно обнаруживали отдельную эндотрансглюкозилазу (или эндотрансглюканазу), названную бета-глюкан со смешанными связями:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазой (MXE) (или бета-глюкан со смешанными связями:ксилоглюкан-эндотрансглюканазой). Последний фермент использует (1,3;1,4)-бета-глюкан со смешанными связями (MLG) в качестве донорного субстрата и ковалентно связывает его с ксилоглюканом или его фрагментом (Fry et al., 2008). К настоящему времени ферменты, катализирующие гетеро-трансглюкозилирование, т.е. использующие качественно иные донорные и акцепторные субстраты, либо обнаружены, но не охарактеризованы подробно (Ait Mohand and Farkas, 2006), либо обнаружены как имеющие минорную активность гетеро-трансглюкозилирования (Hrmova et al., см. ниже).

Показано, что ксилоглюканы ковалентно связаны с пектиновыми полисахаридами (Thompson and Fry 2000). Доказательство ковалентного соединения между ксилоглюканом и кислыми пектинами в клетках розы, культивируемых в суспензии, представлено в Abdel-Massih et al. (2003) и Cumming et al. (2005). Кроме того, Hrmova et al. показали, что ХЕТ из ячменя связывает MLG, гидроксиэтилцеллюлозу и целлюлозу, набухшую под действием серной кислоты, (т.е. сульфат целлюлоза) с ксилоглюканом (Hrmova et al. 2007). В своей способности связывать MLG с ксилоглюканом этот фермент ячменя проявляет активность MXE, составляющую, однако, лишь приблизительно до 0,2% его активности ХЕТ.

Описание настоящего изобретения

К настоящему времени не описана активность трансглюкозилазы, ковалентно связывающей нерастворимую целлюлозу с ксилоглюканом. Такая активность может иметь важное применение в функцио-

нализации целлюлозных материалов, таких как текстильные изделия, бумага или древесная масса.

Таким образом, в первом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белку, имеющему активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (СХЕ), указанный белок содержит (а) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8; или (b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности по отношению к последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8; или (с) аминокислотную последовательность имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности по отношению к последовательности аминокислот 22-280 SEQ ID NO: 2, последовательности аминокислот 26-283 SEQ ID NO: 6 или последовательности аминокислот 29-287 SEQ ID NO: 8.

Если не указано иначе, варианты осуществления и примеры, описываемые ниже в случае конкретных аспектов, представленных в настоящем описании, также применимы к соответствующим вариантам осуществления других аспектов, представленных в настоящем описании.

Как применяют в настоящем описании, с помощью термина "белок" описывают группу молекул, состоящих из более чем 30 аминокислот, в то время как посредством термина "пептид" описывают молекулы, состоящие из до 30 аминокислот. Белки и пептиды могут дополнительно образовывать димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. состоящие из нескольких молекул полипептидов. Молекулы белков или пептидов, образующие димеры, тримеры и т.д., могут являться идентичными или неидентичными. Таким образом, соответствующие структуры более высокого порядка называют гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Термины "белок" и "пептид" также относятся к природно модифицированным белкам или пептидам, где модификация осуществляется, например, посредством гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т.п. Такие модификации хорошо известны в этой области.

Активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (СХЕ) означает активность белка по изобретению, касающуюся катализа переноса звеньев глюкана (или целлоолигосахаридов) с целлюлозы, как донорной молекулы, на ксилоглюкан (или его олигосахариды), как акцепторной молекулы. Более конкретно, белок по изобретению расщепляет β - (1 $\rightarrow$ 4)-глюкозную связь в целлюлозной цепи, а затем вновь образует гликозидную связь с невозстанавливающим остатком ксилоглюканового полимера или олигомера, акцепторного субстрата.

Как применяют в настоящем описании, термин "содержащий" следует истолковывать как определяющий наличие указанных признаков, целых чисел, этапов или компонентов, как это указано, но не исключающий наличия или добавления одного или нескольких признаков, целых чисел, этапов или компонентов или их групп. Таким образом, например, нуклеиновая кислота или белок, содержащие последовательность нуклеотидов или аминокислот, могут содержать больше нуклеотидов или аминокислот, чем фактически процитировано, т.е. могут быть включены в более крупную нуклеиновую кислоту или белок или соединены с другим фрагментом нуклеиновой кислоты или белка. Химерный ген, содержащий область ДНК, функционально или структурно определенную, таким образом, может содержать дополнительные области ДНК и т.д. Однако в контексте настоящего описания термин "содержащий" также включает термин "состоящий из".

Термин "функциональный фрагмент" аминокислотных последовательностей любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8 означает белок или пептид, содержащий фрагмент указанных выше аминокислотных последовательностей, все равно осуществляющий желаемую функцию, т.е. имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы. Анализ для определения того, имеет ли функциональный фрагмент активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, описывают в прилагаемых примерах. Примером функционального фрагмента аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 является фрагмент, содержащий аминокислоты 22-280 SEQ ID NO: 2; примером функционального фрагмента аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 является фрагмент, содержащий аминокислоты 26-283 SEQ ID NO: 6, и примером функционального фрагмента аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 является фрагмент, содержащий аминокислоты 29-287 SEQ ID NO: 8.

В одном из аспектов белок по настоящему изобретению, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95 или по меньшей мере 98% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2, или аминокислотам 22-280 SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 6, или аминокислотам 26-283 SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8, или аминокислотам 29-287 SEQ ID NO: 8. Такие аминокислотные последовательности также включают полученные искусственно аминокислотные последовательности, такие как полученные, например, с помощью мутагенеза нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислоты 22-280 SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 6, или аминокислоты 26-283 SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8, или аминокислоты 29-287 SEQ ID NO: 8. Как правило, аминокислотные последовательности, представленные в настоящем описании, могут иметь по меньшей мере по меньшей мере 70%, например 72, 74, 75, 76, 78%, по меньшей мере 80%, например от 81 до 84%, по меньшей мере 85%, например 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, до 98 и 99% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, или аминокислотам 22-280 SEQ ID NO: 2, или SEQ

ID NO: 6, или аминокислотам 26-283 SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8, или аминокислотам 29-287 SEQ ID NO: 8.

Как применяют в настоящем описании, термин "процент идентичности последовательности" относится к процентной доле идентичных аминокислот между двумя сегментами в окне оптимально выровненных аминокислотных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения хорошо известны специалистам в этой области и их можно осуществлять с помощью таких инструментов, как алгоритм локальной гомологии Smith и Waterman (Waterman, M.S., Chapman & Hall, London, 1995), алгоритм гомологичного выравнивания Needleman и Wunsch (1970), способ поиска сходства Pearson и Lipman (1988) и предпочтительно с помощью компьютеризированных воплощений этих алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, доступные в виде части GCG (зарегистрированная торговая марка), Wisconsin Package (зарегистрированная торговая марка Accelrys Inc., San Diego, Calif.). "Доля идентичности" для выровненных сегментов тестируемой последовательности и референсной последовательности является количеством идентичных компонентов, являющихся общими для двух выравниваемых последовательностей, разделенным на общее количество компонентов в сегменте референсной последовательности, т.е. целой референсной последовательности или определенной меньшей референсной последовательности. Процент идентичности последовательности представляет собой долю идентичности, умноженную на 100. Можно осуществлять сравнение одной или нескольких аминокислотных последовательностей или последовательностей ДНК с полноразмерной аминокислотной последовательностью или последовательностью ДНК, или ее частью, или более длинной аминокислотной последовательностью или последовательностью ДНК. Идентичность последовательности вычисляют с учетом более короткой нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

Только белки, имеющие активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, находятся в объеме настоящего изобретения. Белки, имеющие активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, представленную в настоящем описании, включают аминокислотные последовательности, представленные в настоящем описании, и последовательности с указанной степенью идентичности последовательности, а также с делециями последовательности, одним или многочисленными изменениями последовательности или добавлением функциональных элементов при условии, что активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, по существу, сохраняется. Способы получения таких производных хорошо известны в этой области (см., например, J.F. Sambrook, D.W. Russell, and N. Irwin, 2000). Например, специалист в этой области может разграничивать функциональные элементы в белке, представленном в настоящем описании, и удалять любые несущественные элементы.

Функциональные элементы можно модифицировать или комбинировать для повышения применимости или экспрессии последовательностей по изобретению для любого конкретного применения. Специалисты в этой области знакомы со стандартными методическими материалами, в которых описывают конкретные условия и способы конструирования, манипуляции и выделения макромолекул (например, молекул ДНК, плазмид, белков и т.д.), а также получения рекомбинантных организмов и скрининга и выделения молекул ДНК и белков.

Авторы настоящего изобретения впервые показали, что существуют гетеро-трансглюкозилазы, способные напрямую соединять целлюлозу с ксилоглюканом.

Как указано выше, Baumann et al. описывают ферментативную активность NXG1 из *Tropaeolum majus*, которая может использовать целлоолигосахариды в качестве акцепторов. В том числе, они получали продукты целлобиозы, целлотриозы и целлотетраозы. Это частично противоречит результатам, полученным Ait Mohand et al. (2006), которые смогли получить такие продукты при нанесении флуоресцентных красителей в способе детекции, но не при использовании радиоактивно меченых зондов. Авторы сделали вывод о том, что детектируемая активность может являться искусственной активностью, приписываемой наличию флуоресцентного красителя в целлоолигосахаридах, используемых в качестве акцепторов. Hrmova et al. (2007) показали, что очищенная ХЕТ из семян ячменя катализирует образование ковалентных связей *in vitro* между конкретными растворимыми субстратами (такими как гидроксиэтилцеллюлоза и сульфат целлюлозы) и ксилоглюканом. Авторы указывают, что показано, что такая активность имеет любое значение *in vivo*. Для такой демонстрации необходимо выделение короткого фрагмента из 10 или менее гликозильных остатков, которые, как можно четко показать, происходят из двух разных типов полисахаридов, таких как целлюлоза и ксилоглюкан.

К настоящему времени не показана ферментативная активность, связывающая целлюлозу с ксилоглюканом, в противоположность растворимому целлюлозному материалу, такому как гидроксиэтилцеллюлоза или целлюлоза, набухающая под действием серной кислоты. Как показано в прилагаемых примерах, авторы настоящего изобретения обнаруживали в *Equisetum* нуклеиновые кислоты, кодирующие фермент с такой активностью. С помощью нового способа, позволяющего напрямую измерять новую активность с использованием целлюлозы в качестве донора, они неожиданно смогли показать, что новый фермент способен переносить нерастворимую донорную целлюлозу на растворимый ксилоглюкан, в то время как в предшествующих исследованиях смогли лишь идентифицировать ферментативную активность в отношении растворимых производных целлюлозы. Сравнивая полученные результаты с результатами, полученными для других комбинаций доноров и акцепторов, авторы настоящего изобретения дополнительно

показали, что новая активность является одной из преобладающих активностей белка по изобретению.

Термин "преобладающая активность" означает активность белка, представленного в настоящем описании как целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилаза, представляющую собой по меньшей мере 5% от наиболее высокой активности в отношении других доноров/акцепторов. В одном из примеров активность составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере столько же (по меньшей мере 100%), по меньшей мере 200, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 1000% от наиболее высокой активности в отношении других доноров/акцепторов. Белок по изобретению может иметь несколько преобладающих активностей, например две или три, предпочтительно отличающихся в 10 или менее раз. Белок по изобретению также может иметь одну или несколько активностей, касающихся растворимых производных целлюлозы, таких как водорастворимый ацетат целлюлозы, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, сульфат целлюлозы.

В этой области известны способы измерения и сравнения активности фермента в отношении различных комбинаций растворимых доноров/акцепторов, и их также можно найти в прилагаемых примерах. В прилагаемых примерах описывают способ определения активности фермента в отношении (нерастворимой) целлюлозы в качестве донорной молекулы. Природа растворимых или нерастворимых донорных молекул не позволяет определять ферментативную активность строго в одинаковых условиях, т.к., например, целлюлоза в качестве нерастворимой донорной молекулы гораздо менее доступна для фермента, чем растворимые донорные молекулы. Однако в целях по настоящему изобретению сравнение различных активностей можно осуществлять в условиях, описываемых в прилагаемых примерах для растворимых и нерастворимых донорных молекул.

В одном из примеров белок по изобретению дополнительно имеет активность МХЕ.

Также описывают выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, представленный в настоящем описании.

Нуклеиновые кислоты могут являться ДНК или РНК, одно- или двухцепочечными. Нуклеиновые кислоты можно химически синтезировать или получать с помощью биологической экспрессии *in vitro* или даже *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты можно химически синтезировать с использованием соответствующим образом защищенных фосфорамидатов рибонуклеозидов и общепринятого синтезатора ДНК/РНК.

Поставщиками реагентов для синтеза РНК являются Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA), Pierce Chemical (часть Perbio Science, Rockford, IL, USA), Glen Research (Sterling, VA, USA), ChemGenes (Ashland, MA, USA) и Cruachem (Glasgow, UK).

Применительно к химерному гену по настоящему изобретению, ДНК включает кДНК и геномную ДНК.

Как применяют в настоящей заявке, термин "выделенная нуклеиновая кислота" или "выделенная последовательность нуклеиновой кислоты" относится к нуклеиновой кислоте, как определено выше, не являющейся природной (такой как искусственная или синтетическая нуклеиновая кислота с иной нуклеотидной последовательностью, чем природная нуклеиновая кислота, или нуклеиновая кислота, более короткая, чем природная нуклеиновая кислота) или более не находящейся в природном окружении, в котором она исходно находилась, например нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность, связанную с гетерологичным регуляторным элементом (такая как бактериальная кодирующая последовательность, функционально связанная с промотором, экспрессирующимся в растениях) в химерном гене, или нуклеиновая кислота, перенесенная в другую клетку-хозяина, такую как трансгенная растительная клетка.

Белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (СХЕ), представленный в настоящем описании, может являться белком НТГ.

Как применяют в настоящем описании, "белок НТГ", также называемый "ферментом НТГ", "гетеро-транс-β-глюканазой" или "гетеро-транс-β-глюкозилазой", является гетеро-трансглюкозилазой, или гетеро-трансгликаназой, основной активностью которой является активность гетеро-трансглюкозилазы. Указанная основная активность может составлять по меньшей мере 50, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 70% общей активности. НТГ может иметь активность МХЕ и СХЕ.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (СХЕ), или указанный белок НТГ, можно встраивать в растения для получения модифицированных целлюлозных микрофибрилл в живом растении, например сельскохозяйственной культуре.

Полагают, что экспрессия нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в растении приведет к активности полученного фермента, ковалентно связывающего некоторые из молекул целлюлозы в растении с его эндогенным ксилоглюканом, таким образом укрепляя клеточную стенку, например, в продуктах из растительных волокон. Укрепление стенки также может быть применимым в любой сельскохозяйственной культуре, например, для минимизации полегания (сельскохозяйственных) растений, таких как зерновые злаки или масличные культуры, или для повышения прочности лесных или сельскохозяйственных культур.

Альтернативно, растение, экспрессирующее нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании, можно подкармливать ксилоглюканом или генетически изменять для эндогенного синтеза ксилоглюкана, где указанный ксилоглюкан в случае подкормки, необязательно, содержит связанную с ним дополнительную органическую или неорганическую молекулу (как дополнительно описывают ниже). Потенциальное применение включает целлюлозную бумагу, целлюлозные текстильные изделия, например хлопковые или льняные, целлюлозную упаковку, например картон, целлюлозные строительные материалы, например пиломатериалы и древесностружечные плиты, производные целлюлозы, например карбоксиметилцеллюлозу или ацетат целлюлозы, загустители, например ксантановую камедь или ее производные, целлюлозные перевязочные материалы, например хлопковую вату, марлю, целлофан, диализные трубки, целлюлозные сорбенты для хроматографических колонок; присоединяемые органические или неорганические вещества можно выбирать так, чтобы сделать возможной аффинную хроматографию.

В другом примере растение, экспрессирующее нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании, можно собирать в условиях поддержания активностей фермента HTG, например, в растительных волокнах, таким образом, что ксилоглюкан или ксилоглюкановый олигосахарид, необязательно, содержащий связанное с ним органическое или неорганическое вещество, можно встраивать в целлюлозу после сбора без дальнейшего добавления фермента. Потенциальное применение указано выше.

Альтернативно, белок HTG можно экспрессировать гетерологично, например, в микроорганизме, и после выделения наносить на немодифицированные растительные волокна или (полученную из растений) целлюлозу после сбора в присутствии ксилоглюкана или ксилоглюканового олигосахарида, необязательно, содержащего связанную с ним органическую или неорганическую молекулу, с которым будет ковалентно связываться целлюлоза.

В целом, добавляя белок по изобретению к нерастворимому целлюлозному материалу, т.е. материалу, содержащему целлюлозу, авторы настоящего изобретения способны повышать количество опосредованных ксилоглюканом связей между целлюлозными волокнами. Таким образом, они создали экологически безопасный ферментативный способ улучшения прочности и/или других свойств различных целлюлозных материалов в качестве альтернативы химическим способам, известным к настоящему времени. Альтернативно, белок по изобретению делает возможным ковалентное присоединение новых функциональных групп к целлюлозе посредством ковалентного присоединения модифицированных ксилоглюканов.

В одном из примеров выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, или комплементарным им последовательностям, или нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидам 64-840 SEQ ID NO: 1 или комплементарной им последовательности, или нуклеотидам 76-849 SEQ ID NO: 5 или комплементарной им последовательности, или нуклеотидам 85-861 SEQ ID NO: 7 или комплементарной им последовательности, или последовательность нуклеиновой кислоты, гибридизующуюся в условиях высокой строгости с последовательностью SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, или комплементарными им последовательностями. Указанная выделенная нуклеиновая кислота также может содержать или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, или нуклеотидов 64-840 SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 5, или нуклеотидов 76-849 SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, или нуклеотидов 85-861 SEQ ID NO: 7, или комплементарных им последовательностей. Кроме того, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая может являться выделенной нуклеиновой кислотой, имеющей по меньшей мере 60% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидам 64-840 SEQ ID NO: 1 или комплементарной им последовательности при условии отсутствия нуклеотидов 1-63, или нуклеотидам 76-849 SEQ ID NO: 5 или комплементарной им последовательности при условии отсутствия нуклеотидов 1-75, или нуклеотидам 85-861 SEQ ID NO: 7 или комплементарной им последовательности при условии отсутствия нуклеотидов 1-84. Кроме того, изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая может являться выделенной нуклеиновой кислотой, кодирующей белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности по отношению к последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 6 и 8, в которой частоту использования кодонов адаптируют для экспрессии в бактериях, экспрессии в дрожжах или экспрессии в растениях.

Можно оптимизировать частоту использования кодонов, например, как описывают в Moreira, 2004.

В другом варианте химерный ген обеспечен содержанием следующих функционально связанных элементов: (а) промотор, экспрессирующийся в растениях; (b) нуклеиновую кислоту, кодирующую белок в соответствии с изобретением; и (с) область терминирования транскрипции и полиаденилирования.

Химерный ген является искусственным геном, сконструированным посредством функционального связывания фрагментов неродственных генов или других последовательностей нуклеиновой кислоты. Другими словами, термин "химерный ген" означает ген, в норме не обнаруживаемый в видах растений или относящийся к любому гену, в котором промотор или одна или несколько других регуляторных областей гена в природе не связаны со всей транскрибируемой нуклеиновой кислотой или ее частью, т.е. являются гетерологичными в отношении транскрибируемой нуклеиновой кислоты. Более конкретно,

химерный ген является искусственным, т.е. неприродным, геном, получаемым посредством функционального связывания промотора, экспрессирующегося в растениях, и нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем описании, такой как нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, или нуклеотидов 64-840 SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 5, или нуклеотидов 76-849 SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, или нуклеотидов 85-861 SEQ ID NO: 7, где указанный экспрессирующийся в растениях промотор не является от природы функционально связанным с указанной нуклеиновой кислотой.

Термин "гетерологичный" относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или белка, полученными из разных источников. Например, промотор является гетерологичным в отношении функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как кодирующая последовательность, если такую комбинацию в норме не обнаруживают в природе. Кроме того, конкретная последовательность может являться "гетерологичной" в отношении клетки или организма, в который ее встраивают (т.е. не встречается в природе в этой конкретной клетке или организме). Например, химерный ген, представленный в настоящем описании, является гетерологичной нуклеиновой кислотой.

Выражение "функционально связанный" означает, что указанные элементы химерного гена связывают друг с другом таким образом, что их функционирование является скоординированным и делает возможной экспрессию кодирующей последовательности, т.е. они являются функционально связанными. В качестве примера, промотор является функционально связанным с другой последовательностью нуклеиновой кислоты, если он способен обеспечивать транскрипцию и, в конечном итоге, экспрессию указанной последовательности нуклеиновой кислоты, и две кодирующие белок нуклеотидные последовательности, например последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, являются функционально связанными друг с другом, если они соединены таким образом, что может образовываться слитый белок из первого и второго белка или полипептида.

Промотором может являться любой регуляторный элемент, способный запускать экспрессию гена в желаемой клетке-хозяине или организме, таких как растительные клетки и растения, бактерии или дрожжи. В случае растений можно использовать любую промоторную последовательность гена, в природе экспрессирующегося в растениях, таких как, например, промоторы бактериального, вирусного или растительного происхождения.

Как правило, промоторы могут являться конститутивными или индуцибельными.

Экспрессирующийся в растениях промотор может являться конститутивным промотором, т.е. промотором, способным регулировать высокие уровни экспрессии в большинстве типов клеток (пространственно-независимым образом).

Примеры экспрессирующихся в растениях конститутивных промоторов включают промоторы бактериального происхождения, такие как промоторы октопинсинтазы (OCS) и нопапинсинтазы (NOS) из *Agrobacterium*, а также промоторы вирусного происхождения, такие как промоторы транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) (Hapster et al., 1988) или генов 19S PHK (Odell et al., 1985; патент США № 5352605; WO84/02913; Benfey et al., 1989), промоторы вируса мозаики прожилок маниоки (CsVMV; WO97/48819, US7053205), промотор цирковируса (AU689311), промотор палочковидного баднавируса сахарного тростника (ScBV) (Samac et al., 2004), промотор вируса мозаики норичника шишковатого (FMV) (Sanger et al., 1990), промотор №№ 4 или 7 вируса мозаики клевера подземного (WO96/06932) и усиленный промотор 35S, как описано в US5164316, US5196525, US5322938, US5359142 и US5424200. Среди промоторов растительного происхождения, следует упомянуть промоторы из растительного промотора малой цепи рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Rubisco) (US 4962028), промотор гена гистона H4 *Arabidopsis thaliana* (Chaboute et al., 1987), промоторы убиквитина (Holtorf et al., 1995) кукурузы, риса и сахарного тростника, промотор актина 1 риса (Act-1, US 5641876), гистоновые промоторы, как описано в EP0507 698 A1, и промотор алкогольдегидрогеназы 1 (Adh-1) кукурузы.

Альтернативно, для экспрессии белка, представленного в настоящем описании, можно использовать промоторную последовательность, специфичную для конкретных областей, тканей или органов растений. Примерами таких промоторов, которые можно использовать, являются тканеспецифические или органоспецифические промоторы, подобные примордий-специфичным промоторам (An et al., 1996), стебле-специфичным промоторам (Keller et al., 1988), мезофилл-специфичным промоторам (таким как светоиндуцибельные промоторы Rubisco), волокно-специфичным промоторам, таким как волокно-специфичный промотор волокно-специфичного гена β -тубулина (как описано в WO0210377), волокно-специфичного гена актина (как описано в WO0210413), волокно-специфичного гена липид-транспортного белка (как описано в US5792933), промотор протеазы, специфичной для семенной кожуры и волокон (Hou et al., 2008), промотор волокно-специфичного гена R2R3 MYB хлопка (Pu et al., 2008), промотор гена экспансина хлопка (WO9830698), промотор гена хитиназы хлопка (US2003106097), промотор CesA1 (US6271443), промотор F286 (см. US2003/106097), промотор E6 хлопка (см. US6096950) или промоторы волокно-специфичных генов, описываемые в US6259003, или US6166294, или

WO96040924, корне-специфичным промоторам (Keller et al., 1989), промоторам, специфичным для сосудистых тканей (Peleman et al), семя-специфичным промоторам (Datla, R. et al., 1997), в частности промотор напина (EP255378 A1), промотор фазеолина, промотор глютеина, промотор FBP7 петунии, промотор гелиантинина (WO92/17580), промотор альбумина (WO98/45460), промотор олеозина (WO98/45461), промотор SAT1 или промотор SAT3 (PCT/US98/06978) и т.п.

Также можно использовать индуцибельный промотор, преимущественно выбранный из промоторов фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), HMG-КоА-редуктазы (HMG), хитиназы, глюканазы, ингибитора протеиназы (PI), гена семейства PR1, нопалинсинтазы (nos) и *vspB* (US5670349, табл. 3), промотора HMG2 (US5670349), промотора бета-галактозидазы яблоч (ABG1) и промотора аминокциклопропан-карбоксилат-синтазы (ACC-синтазы) яблоч (WO98/45445).

В этой области хорошо известны подходящие промоторы для (индуцибельной) экспрессии в бактериях, и они включают промоторы T3 или T7 (применительно к экспрессии РНК-полимеразы T3 или T7), промотор *lac*, промоторы *trc* и *tac*, фаговый промотор pL, промотор *tetA* и промоторы PPBAD или *rhoP-BAD*.

В этой области хорошо известны промоторы, подходящие для экспрессии в дрожжах, и они включают промотор TEF, промотор CYC1, промотор ADH1, промотор AOX1 (метанол-индуцибельный) и промотор GAL и их варианты.

(Экспрессирующийся в растениях) промотор, например, можно изменять так, чтобы он содержал, например, "ДНК-энхансер" для содействия повышению экспрессии гена. Как хорошо известно в этой области, для повышения транскрипции ДНК можно использовать конкретные элементы ДНК. Эти энхансеры часто обнаруживают в 5'-направлении к началу транскрипции в промоторе, функционирующем в эукариотических клетках, но его часто можно встраивать выше (5') или ниже (3') кодирующей последовательности. В некоторых случаях, этими энхансерными элементами ДНК являются интроны. Среди интронов, применимых в качестве ДНК-энхансера, есть 5'-интроны гена актина риса 1 (см. US5641876), гена актина риса 2, интрон гистона 4 резуховидки, гена алкогольдегидрогеназы кукурузы, гена белка теплового шока 70 (см. US5593874) кукурузы, гена *shrunkен 1* кукурузы, гена светочувствительности 1 *Solanum tuberosum* и гена белка теплового шока 70 *Petunia hybrida* (см. US5 659122). Таким образом, как предусмотрено в настоящем описании, промотор или промоторная область включает варианты промоторов, полученные посредством инсерции или делеции регуляторных областей, подвергания промотора случайному или сайт-специфическому мутагенезу и т.д. Активность или силу промотора можно измерять в терминах количества РНК, которую он продуцирует, или степени накопления белка в клетке или ткани относительно промотора, транскрипционную активность которого оценивали ранее.

Химерный ген в соответствии с изобретением также содержит последовательность терминирования транскрипции или полиаденилирования, например, функционирующую в растительной клетке. В качестве последовательности терминирования транскрипции или полиаденилирования можно использовать любую соответствующую последовательность бактериального происхождения, такую как, например, терминатор *nos* *Agrobacterium tumefaciens*, вирусного происхождения, такую как, например, терминатор CaMV 35S, или растительного происхождения, такую как, например, гистоновый терминатор, как описано в опубликованной патентной заявке EP063317 A1.

В объеме настоящего изобретения в комбинации с промотором и нуклеиновой кислотой, представленной в настоящем описании, также можно использовать другие регуляторные последовательности, находящиеся между указанным промотором и указанной нуклеиновой кислотой. Неограничивающие примеры таких регуляторных последовательностей включают активаторы транскрипции ("энхансеры") или интроны, как описано где-либо в настоящей заявке. Другие подходящие регуляторные последовательности включают 5'-UTR. Как применяют в настоящем описании, 5'-UTR, также обозначаемая как лидерная последовательность, является конкретной областью матричной РНК (мРНК), находящейся между участком начала транскрипции и инициаторным кодоном кодирующей области. Она связана со стабильностью мРНК и эффективностью трансляции. Например, для повышения устойчивых уровней экспрессии репортерного гена можно использовать 5'-нетранслируемую лидерную последовательность гена хлорофилл *a/b*-связывающего белка петунии ниже участка начала транскрипции 35S (Harpster et al., 1988). В WO95/006742 описывают использование 5'-нетранслируемых лидерных последовательностей, полученных из генов, кодирующих белки теплового шока, для повышения экспрессии трансгена. В настоящем изобретении также можно использовать активаторы трансляции лидерной последовательности вируса табачной мозаики (TMV), описываемые в заявке WO87/07644, а также лидерной последовательности вируса гравировки табака (TEV), описываемые в Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64: 1590-1597.

Химерный ген дополнительно может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность локализации белка для транспорта экспрессируемого белка в конкретные органеллы или компартменты в клетке-хозяине или для секреции.

Последовательность локализации белка является короткой (3-60 аминокислот в длину) аминокислотной последовательностью, направляющей транспорт белка внутри или вне клетки. Пептиды локализации белка также можно называть сигнальными пептидами (для секреции), транзитными пептидами (для локализации в пластидах) или последовательностями удержания белка.

Подходящей сигнальной последовательностью для секреции белка, экспрессируемого в дрожжах, таких как *Pichia pastoris*, является сигнальная последовательность α -фактор-сопряженного белка (Cregg et al., 1993). Примером сигнального пептида для секреции слитых белков в растениях является сигнальный пептид белка PR1a *Nicotiana tabacum* (Cornelissen et al. 1986).

Слияние таких сигнальных последовательностей с белком, представленным в настоящем описании, посредством соединения фрагментов ДНК, кодирующей соответствующий белок и сигнальную последовательность, можно осуществлять стандартными способами рекомбинантной ДНК.

Вектор, содержит химерный ген, представленный в настоящем описании.

Вектор, например, может являться плазмидой, космидой, вирусом, бактериофагом или другим вектором, общепринято используемым, например, в генетической инженерии.

Молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно встраивать в несколько коммерчески доступных векторов. Неограничивающие примеры включают прокариотические плазмидные векторы, такие как серия pUC, pBluescript (Stratagene), серия экспрессирующих векторов pET (Novagen) или pCRIPTO (Invitrogen), lambda gt11, pJOE, серия pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 и векторы, совместимые с экспрессией в эукариотических клетках, таких как дрожжи или клетки млекопитающих, подобные pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pLZD35, вектору Окаяма-Берга pcDV1, экспрессирующему кДНК (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) и pCiNeo (Promega). Примеры плазмидных векторов, подходящих для дрожжей *Pichia pastoris*, включают, например, плазмиды pA0815, pPICZ, pPICZ α , pPIC9K и pPIC3.5K (все Invitrogen).

Подходящие векторы для введения в растения включают векторы, описываемые в Cornelissen and Vandewiele (1989), Lindbo (2007), Gritch et al. (2006) или Wagner et al. (2004).

Кроме того, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей химерный ген или вектор, представленный в настоящем описании. Подходящие прокариотические клетки-хозяева включают, например, бактерии родов *Escherichia*, *Streptomyces*, *Salmonella* или *Bacillus*. Подходящими эукариотическими клетками-хозяевами являются, например, дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*. Клетками насекомых, подходящими для экспрессии, являются, например, клетки S2 *Drosophila* или Sf9 *Spodoptera*. Растительные клетки, подходящие для настоящего изобретения, включают любую растительную клетку, содержащую, главным образом, генетическую информацию, необходимую для определения растения, которую, помимо химерного гена, представленного в настоящем описании, можно дополнять одним или несколькими дополнительными трансгенами. Клетки можно получать из различных органов и/или тканей, образующих растение, включая, в качестве неограничивающих примеров, плоды, семена, зародыши, репродуктивную ткань, меристемные области, каллусную ткань, листья, корни, побеги, цветы, сосудистую ткань, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры.

В одном из примеров клетка-хозяин по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный химерный ген, содержащий (экспрессирующий в растениях) промотор, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, способный синтезировать ксиллоглюкан в указанной клетке-хозяине, и область терминации транскрипции и полиаденилирования. Например, один химерный ген может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CslC4 из резуховидки (Cocuron et al., 2007), в комбинации с другим химерным геном, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую альфаксилотрансферазу XT1 из резуховидки (Faik et al., 2002). Как описано далее, этот вариант осуществления служит для продукции целлюлозы, ковалентно связанной с ксиллоглюканом (олигосахаридами), в случае, когда клетка-хозяин сама по себе не продуцирует ксиллоглюкан.

Кроме того, настоящее изобретение относится к растению, части растения или семени, содержащему химерный ген, представленный в настоящем описании, вектор, представленный в настоящем описании, или растительную клетку, представленную в настоящем описании.

Растение по настоящему изобретению может являться любым растением. Неограничивающие примеры растений по изобретению включают пшеницу, хлопок, канолу и другой масличный рапс, рис, кукурузу, сою, сорго, подсолнечник, табак, сахарную свеклу, кукурузу, ячмень, томат, манго, персик, яблоко, грушу, клубнику, банан, дыню, картофель, морковь, салат-латук, капусту, лук, тростник, горох, конские бобы, тополь, виноград, цитрусовые, люцерну, рожь, овес, газонные и кормовые травы, лен, орехоплодные растения и растения, из которых получают древесину, такие как *Pinus*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Larix*, *Thuja*, *Abies*, *Khaya*, *Acer*, *Lophira*, *Fagus*, *Diospyros*, *Quercus*, *Tilia*, *Populus*, *Platanus*, *Tectona*, *Robinia*, *Ulmus* и *Juglans*.

В дополнение к примерам, указанным выше для растительных клеток, части растений включают клетки, ткани или органы, семянки, семена, отделенные части, такие как корни, листья, цветы, пыльцу и т.д. Термин "растение" также включает потомство растений, сохраняющее отличительные характеристики родителей, такое как семя, полученное самоопылением или скрещиванием, например гибридное семя, гибридные растения и полученные из них части растений.

Семя образовано зародышевым растением, заключенным вместе с накопленными питательными

веществами в семенную кожуру. Оно является продуктом созревшего семязачатка голосеменных и покрытосеменных растений, к последним из которых принадлежит соя, возникающим после оплодотворения и, до некоторой степени, растущим в материнском растении. Семя, представленное в настоящем описании, сохраняет отличительные характеристики родителей, такое как семя, полученное самоопылением или скрещиванием, например гибридное семя (полученное скрещиванием двух инбредных растительных линий).

Растительная клетка, часть растения, растение или семя могут быть из растений, указанных выше, а также из генетически модифицированных гомологов этих растений.

В случае хлопка растительная клетка, часть растения, растение или семя хлопка может быть из любого существующего сорта хлопка. Например, растительная клетка хлопка может быть из сорта, применимого для выращивания хлопка. Наиболее общепотребительными сортами хлопка являются *Gossypium barbadense*, *G. hirsutum*, *G. arboreum* и *G. herbaceum*. Дополнительные сорта включают *G. africansum* и *G. raimondii*.

Кроме того, изобретение относится к потомству растения по изобретению или семени по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного растения, включающему (a) получение химерного гена, представленного в настоящем описании; и (b) встраивание указанного химерного гена в растение.

"Встраивание" применительно к настоящей заявке относится к помещению генетической информации в растительную клетку или растение искусственными способами. Это можно осуществлять любым известным в этой области способом встраивания РНК или ДНК в растительные клетки, ткани, протопласты или целые растения. Кроме того, "встраивание" также включает интрогрессию генов, как описано ниже.

Доступен ряд способов переноса ДНК в растительные клетки. Опосредуемую агробактериями трансформацию хлопка описывают, например, в патенте США № 5004863, патенте США № 6483013 и WO2000/71733.

Растения также можно трансформировать с помощью бомбардировки частицами: частицы золота или вольфрама покрывают ДНК, а затем бомбардируют ими клетки молодых растений или зародыши растений. Этот способ также делает возможной трансформацию пластид растений. Трансформацию хлопка посредством бомбардировки частицами описывают, например, в WO92/15675.

Вирусную трансформацию (трансдукцию) можно использовать для транзиторной или стабильной экспрессии гена в зависимости от природы вирусного генома. Желаемый генетический материал упаковывают в подходящий вирус растений и модифицированному вирусу позволяют инфицировать растение. Потомство инфицированных растений не содержит вирус, а также не содержит встроенный ген. Подходящие способы вирусной трансформации описывают, например, в WO90/12107, WO03/052108 или WO2005/098004.

Термин "интрогрессия" означает интеграцию гена в растительный геном природными способами, т.е. посредством скрещивания растения, содержащего химерный ген, представленный в настоящем описании, с растением, не содержащим указанный химерный ген. Можно выбирать потомка, содержащего химерный ген.

Дополнительные способы трансформации и интрогрессии также можно найти в патенте США № 7172881.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении описывают способ получения растения или укрепления растения или его части, такой как стенка растительной клетки, включающий: встраивание химерного гена, содержащего промотор, экспрессирующийся в растениях, нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании выше (т.е. кодирующую белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы), и область терминирования транскрипции и полиаденилирования; или выращивание растения, представленного в настоящем описании, или выращивание растения из семени, представленного в настоящем описании. Встраиваемый химерный ген может являться химерным геном, как представлено в настоящем описании выше, включающим все относящиеся к нему варианты.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу изменения по меньшей мере одного свойства волокна в растении, продуцирующем волокна, или укрепления растения, содержащего экспрессируемый химерный ген, представленный в настоящем описании, или вектор, представленный в настоящем описании, в указанном растении, продуцирующем волокна, или растении.

В одном из примеров свойство волокна является прочностью волокна и/или устойчивостью к ферментативному расщеплению. В одном из примеров повышают прочность волокна и/или устойчивость к ферментативному расщеплению.

В другом примере укрепление растения включает укрепление его стебля, повышение устойчивости к полеганию (например, наводнению, ливневому дождю или повреждению ветром) и повышение устойчивости к инфицированию патогенами.

В дополнительном примере описываемого выше способа получения растения или укрепления растения он дополнительно включает выращивание указанного растения до получения семян.

Настоящее изобретение также относится к способу получения белка, включающему культивирование клетки-хозяина, представленной в настоящем описании, в подходящих условиях и выделение продуцируемого белка. Указанная клетка-хозяин экспрессирует или гиперэкспрессирует белок по изобретению, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, как описано выше. Таким образом, указанный белок по изобретению продуцируется в клетке-хозяине, и его выделяют из нее. В случае, когда клетка-хозяин продуцирует белок по изобретению и секретирует его в окружающую среду, например, благодаря подходящему сигнальному пептиду, соединенному с белком, выделение означает отделение сред, содержащих белок из клетки-хозяина. Затем указанные среды можно подвергать дальнейшим этапам очистки (см. ниже).

Подходящие условия культивирования прокариотического или эукариотического хозяина хорошо известны специалистам в этой области. Например, подходящими условиями культивирования бактерий является их выращивание в среде Лурия-Бертани (LB) с аэрацией. Для повышения выхода и растворимости продукта экспрессии среду можно забуферивать или дополнять подходящими добавками, о которых известно, что они повышают или облегчают их. *E. coli* можно культивировать при температуре от 4 до приблизительно 37°C, точная температура или последовательность температур зависит от молекулы, подлежащей гиперэкспрессии. В целом, специалисту также известно, что эти условия, возможно, необходимо адаптировать к потребностям хозяина и требованиям в отношении экспрессируемого полипептида. В случае, когда индуцибельный промотор контролирует нуклеиновую кислоту по изобретению в векторе, присутствующем в клетке-хозяине, экспрессию полипептида можно индуцировать добавлением соответствующего индуцирующего средства. Подходящие способы и стратегии экспрессии известны специалисту в этой области.

Подходящие способы экспрессии в случае эукариотических клеток хорошо известны специалисту в этой области, и их можно найти, например, в Sambrook, 2001.

Подходящими средами для культуры клеток насекомых являются, например, TNM+10% FCS или среда SF900. Как правило, клетки насекомых выращивают при 27°C в виде адгезионной или суспензионной культуры.

Способы выделения продуцируемого полипептида хорошо известны в этой области, и они включают, в качестве неограничивающих примеров, такие этапы способа, как осаждение сульфатом аммония, ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию (эксклюзионную хроматографию), аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), обращенно-фазовую ВЭЖХ, диск-электрофорез в геле или иммунопреципитацию, см., например, в Sambrook, 2001.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу выращивания растения, включающему (a1) получение трансгенного растения, представленного в настоящем описании или получаемого способом получения растения, представленным в настоящем описании; или (a2) встраивание химерного гена, представленного в настоящем описании, в растение; и (b) выращивание растения (a1) или (a2); и, необязательно, (c) сбор пригодных для сбора частей, продуцируемых указанным растением.

Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности по изобретению можно использовать для идентификации других белков, таких как ортологичные белки или гомологичные белки, с активностью HTG или, более конкретно, с активностью CXE. Гомологичные или ортологичные последовательности, кодирующие белки HGT, можно идентифицировать известными в этой области способами. Гомологичную нуклеотидную последовательность можно идентифицировать и выделять посредством гибридизации в строгих условиях с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 5 и 7 или ее часть, в качестве зондов. Другие последовательности, кодирующие белки HTG, также можно получать посредством амплификации ДНК с использованием олигонуклеотидов, специфичных для генов, кодирующих HTG, в качестве праймеров, таких как, в качестве неограничивающих примеров, олигонуклеотиды, содержащие или состоящие из от приблизительно 20 до приблизительно 50 последовательных нуклеотидов из любой из SEQ ID NO: 1, 5 и 7 или комплементарных им последовательностей. Гомологичные гены, кодирующие белки HTG, можно идентифицировать *in silico* с помощью поиска гомологии с помощью Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) с использованием других нуклеотидных последовательностей или аминокислотных последовательностей. Функциональность идентифицированных гомологичных генов, кодирующих HTG, и, в частности, их активности MXE и CXE можно подтверждать способами, представленными в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу детекции экспрессии нуклеиновой кислоты или белка, включающему (a) получение растительной клетки или растения, представленного в настоящем описании, где указанный трансген является нуклеиновой кислотой или белком, представленным в настоящем описании (т.е. кодирующей белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы); и (b) детекцию уровня экспрессии нуклеиновой кислоты или белка.

Термин "экспрессия нуклеиновой кислоты или белка" относится к транскрипции и, необязательно, трансляции транскрибируемой и транслируемой части химерного гена, представленного в настоящем

описании, с использованием соответствующих элементов контроля экспрессии, функционирующих в растительных клетках.

"Детекцию экспрессии нуклеиновой кислоты или белка" можно осуществлять множеством способов. Белок имеет активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы. Таким образом, экспрессию можно определять с использованием субстрата, который может превращаться в визуально определяемый продукт, где указанный продукт можно определять соответствующими способами, зависящими от цвета указанного продукта или длины волны света, испускаемого указанным продуктом. Подходящие способы детекции описывают в разделе "Примеры". Кроме того, экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты можно измерять способами ПЦР, включая способ, описываемый в Zani et al. (2009) и в Logan, Edwards and Saunders (2009), способами секвенирования, включая описываемые в техническом описании Illumina "mRNA expression analysis" (2010), доступном в http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_mrna_expression.pdf, и способами гибридизации, хорошо известными в этой области.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения целлюлозного материала с улучшенными свойствами, включающему приведение целлюлозного материала, например, в водной среде в контакт с эффективным количеством белка по изобретению в присутствии ксилоглюкана или ксилоглюканового олигосахарида или ксилоглюкана или ксилоглюканового олигосахарида, с которым ковалентно связана органическая или неорганическая молекула.

Улучшенные свойства включают повышенную прочность или реакционную способность или другие свойства, такие как цвет (например, устойчивое окрашивание одежды, пиломатериалов, находящихся на открытом воздухе, и т.д.)/заряд (кислый или основной), необычные бумажные поверхности, например, для банкнот и юридических документов, медицинские вещества, например антибиотики или лекарственные средства, лабораторные реагенты, например индикаторную бумагу, не теряющую индикатор при длительном воздействии воды.

Белок по изобретению можно использовать для ковалентного присоединения целлюлозы или целлоолигосахаридов к ксилоглюкану или ксилоглюкановым олигосахаридам, где указанный ксилоглюкан или ксилоглюкановые олигосахарида, необязательно, содержат связанные с ними, например, на восстанавливаемом конце различные органические или неорганические соединения, которые повышали бы полезность целлюлозы.

В одном из примеров целлюлозный материал выбран из или содержится в ткани (текстильных изделиях, таких как хлопковые или льняные), бумаге, производных целлюлозы, таких как карбоксиметилцеллюлоза или ацетат целлюлозы, упаковке, такой как картон, строительном материале (например, пиломатериалах и древесностружечных плитах), загустителях, таких как включающие и полученные из ксантановой камеди, медицинском перевязочном материале, таком как хлопковая вата и марля, целлофане, диализных трубках и смоле для хроматографических колонок.

Например, для изменения цвета материала молекула, связанная с ксилоглюканом, будет красителем. Такая комбинация может приводить к устойчивому окрашиванию, например, одежды или пиломатериалов, находящихся на открытом воздухе, получаемому в очень мягких условиях и без загрязняющих окружающую среду побочных продуктов.

Другие свойства, которые можно изменять в результате присоединения молекулы с соответствующими свойствами к ксилоглюкану в рамках способа получения целлюлозного материала с улучшенными свойствами, включают заряд (кислый или основной), необычные бумажные поверхности, например, для банкнот и юридических документов, медицинские вещества, например антибиотики или лекарственные средства, лабораторные реагенты, например индикаторную бумагу, не теряющую индикатор при длительном воздействии воды, и многие другие.

Таким образом, в одном из примеров способ получения целлюлозного материала с улучшенными свойствами включает присоединение молекулы, имеющей или придающей желаемое свойство ксилоглюкану или ксилоглюкановым олигосахаридам, не содержащим такую присоединенную молекулу, при этом указанное присоединение осуществляют до приведения указанного ксилоглюкана или ксилоглюкановых олигосахаридов в контакт с указанным целлюлозным материалом и белком по изобретению. Молекула может являться органической или неорганической. Присоединение органических веществ к восстанавливаемому концу ксилоглюканового олигосахарида можно осуществлять способом с использованием олигосахаридил-1-амино-1-дезоксигалактозы, описываемым в WO97/011193.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения целлюлозного материала с улучшенными свойствами, включающему получение растения по изобретению и сбор целлюлозного материала из указанного растения.

Сбор целлюлозного материала может являться сбором растения по изобретению, содержащего целлюлозный материал, общепринятыми способами. Сбор целлюлозного материала также может являться сбором частей растений, содержащих целлюлозный материал по изобретению, общепринятыми способами, такими как использование стандартных уборочных машин.

Целлюлозный материал дополнительно можно выделять из собранного материала.

Также описывают целлюлозный материал, получаемый способом получения целлюлозного мате-

риала, представленным в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к целлюлозному материалу, содержащему целлюлозный материал, ковалентно присоединенный к ксилоглюкану или ксилоглюкановым олигосахаридам через гликозидную связь. В частности, указанный целлюлозный материал содержит целлюлозу или целлоолигосахариды, соединенные через бета-гликозидную связь с ксилоглюканом или его олигосахаридами.

В одном из примеров указанного целлюлозного материала органическую или неорганическую молекулу ковалентно присоединяют к указанному ксилоглюкану или ксилоглюкановому олигосахариду, как описано выше. Эффект такой модификации обсуждают в другой части настоящей заявки.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору, содержащему (а) целлюлозный материал, не содержащий связанный с ним ксилоглюкан или ксилоглюкановый олигосахарид, и (б) ксилоглюкан и/или ксилоглюкановый олигосахарид. Набор предназначен для предоставления компонентов для производства целлюлозного материала по изобретению, как описывают где-либо в настоящей заявке. Необязательно, набор дополнительно может содержать белок по изобретению, как представлено в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу против белка по изобретению. Антитело относится к интактным молекулам или их фрагментам, способным связывать эпитоп белка по изобретению. Антитела, связывающие белок по изобретению, можно получать с использованием интактных полипептидов или фрагментов, содержащих небольшие интересующие пептиды для иммунизации.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения пищи или корма, таких как масло, мука крупного помола, зерно, крахмал, мука или белок, или промышленного продукта, такого как биотопливо, волокно, промышленные химикаты, фармацевтического или нутрицевтического средства, при этом указанный способ включает получение растения или его части по изобретению и получения пищи, корма или промышленного продукта из растения или его части.

"Условия высокой строгости" или "условия гибридизации высокой строгости" можно обеспечивать, например, посредством гибридизации при 65°C в водном растворе, содержащем 6-кратный SSC (20-кратный SSC содержит 3,0 M NaCl, 0,3 M цитрат Na, pH 7,0), 5-кратный раствор Денхардта (100-кратный раствор Денхардта содержит 2% фикоил, 2% поливинилпирролидон, 2% бычий сывороточный альбумин), 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 20 мкг/мл денатурированную ДНК-носитель (одноцепочечную ДНК спермы рыбы со средней длиной 120-3000 нуклеотидов) в качестве неспецифического конкурента. После гибридизации можно осуществлять промывку высокой строгости в несколько этапов с конечной промывкой (приблизительно 30 мин) при температуре гибридизации в 0,2-0,1-кратном SSC, 0,1% SDS.

Термин "условия умеренной строгости" или "условия гибридизации умеренной строгости" относится к условиям, эквивалентным гибридизации в описываемом выше растворе, но приблизительно при 60-62°C. Промывку в условиях умеренной строгости можно осуществлять при температуре гибридизации в 1-кратном SSC, 0,1% SDS.

Термин "условия низкой строгости" или "условия гибридизации низкой строгости" относится к условиям, эквивалентным гибридизации в описываемом выше растворе приблизительно при 50-52°C. Промывку в условиях низкой строгости можно осуществлять при температуре гибридизации в 2-кратном SSC, 0,1% SDS. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook and Russell (2001).

В дополнение к описываемому химерному гену, трансформированные растительные клетки и растения, представленные в настоящем описании или полученные способами, представленными в настоящем описании, могут содержать по меньшей мере один другой химерный ген, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую интересующий продукт экспрессии. Примеры такого продукта экспрессии включают молекулы РНК или белки, такие как, например, фермент для устойчивости к гербициду. Устойчивыми к гербициду растениями хлопка являются, например, глифосат-устойчивые растения, т.е. растения, полученные устойчивыми к гербициду глифосату или его солям. Растения можно делать устойчивыми к глифосату различными способами. Например, глифосат-устойчивые растения можно получать посредством трансформации растения с использованием гена, кодирующего фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS).

Примерами таких генов EPSPS являются ген *AroA* (мутант CT7) бактерии *Salmonella typhimurium* (Comai et al., 1983, Science 221, 370-371), ген *CP4* бактерии *Agrobacterium* sp. (Barry et al., 1992), гены, кодирующие EPSPS *Petunia* (Shah et al., 1986), EPSPS томата (Gasser et al., 1988) или EPSPS *Eleusine* (WO01/66704). Он также может являться мутантным EPSPS, как описано, например, в EP 0837944, WO00/66746, WO00/66747 или WO02/26995. Глифосат-устойчивые растения также можно получать посредством экспрессии гена, кодирующего фермент глифосат-оксидоредуктазу, как описано в патентах США №№ 5776760 и 5463175. Глифосат-устойчивые растения также можно получать посредством экспрессии гена, кодирующего фермент глифосат-ацетилтрансферазу, как описано, например, в WO02/36782, WO03/092360, WO05/012515 и WO07/024782. Глифосат-устойчивые растения также можно получать посредством селекции растений, содержащих природные мутации указанных выше генов, как

описано, например, в WO01/024 615 или WO03/01322 6. Растения, экспрессирующие гены EPSPS, придающие устойчивость к глифосату, описывают, например, в патентных заявках США №№ 11/517991, 10/739610, 12/139408, 12/352532, 11/312866, 11/315678, 12/421292, 11/400598, 11/651752, 11/681285, 11/605824, 12/468205, 11/760570, 11/762526, 11/769327, 11/769255, 11/943801 или 12/362774. Растения, содержащие другие гены, придающие устойчивость к глифосату, такие как гены декарбоксилазы, описывают, например, в патентных заявках США №№ 11/588811, 11/185342, 12/364724, 11/185560 или 12/423926.

Другими устойчивыми к гербицидам растениями хлопка являются, например, растения, полученные устойчивыми к гербицидам, ингибирующим фермент глутаминсинтазу, таким как биалафос, фосфинотрицин или глюфосинат. Такие растения можно получать посредством экспрессии фермента, нейтрализующего гербицид, или мутантного фермента глутаминсинтазы, устойчивого к ингибированию, например, описываемого в патентной заявке США № 11/760602. Одним из таких эффективных нейтрализующих ферментов является фермент, кодирующий фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (такой как белок *bar* или *pat* из видов *Streptomyces*). Растения, экспрессирующие экзогенную фосфинотрицин-ацетилтрансферазу, описывают, например, в патентах США №№ 5561236; 5648477; 5646024; 5273894; 5637489; 5276268; 5739082; 5908810 и 7112665.

Дополнительными гербицид-устойчивыми растениями хлопка также являются растения, полученные устойчивыми к гербицидам, ингибирующими фермент гидроксифенилпируватдиоксигеназу (HPPD). HPPD является ферментом, катализирующим реакцию, в которой пара-гидроксифенилпируват (HPP) превращается в гомогентизат. Растения, устойчивые к ингибиторам HPPD, можно трансформировать с использованием гена, кодирующего природный устойчивый фермент HPPD, или гена, кодирующего мутантный или химерный фермент HPPD, как описано в WO96/38567, WO99/24585, WO99/24586, WO2009/144079, WO2002/046387 или US6768044. Устойчивости к ингибиторам HPPD также можно достигать посредством трансформации растений с использованием генов, кодирующих конкретные ферменты, делающие возможным образование гомогентизата, несмотря на ингибирование нативного фермента HPPD ингибитором HPPD. Такие растения и гены описывают в WO99/34008 и WO02/36787. Устойчивость растений к ингибиторам HPPD также можно улучшать посредством трансформации растений с использованием гена, кодирующего фермент, имеющий активность префенат-дегидрогеназы (PDH), в дополнение к гену, кодирующему HPPD-устойчивый фермент, как описано в WO2004/024928. Кроме того, растения можно делать более устойчивыми к гербицидам-ингибиторам HPPD, добавляя в их геном ген, кодирующий фермент, способный метаболизировать или подвергать деградации ингибиторы HPPD, такой как ферменты CYP450, представленные в WO2007/103567 и WO2008/150473.

Другими устойчивыми к гербицидам растениями хлопка являются растения, полученные устойчивыми к ингибиторам ацетолактатсинтазы (ALS). Известные ингибиторы ALS включают, например, гербициды сульфонилкарбамид, имидазолинон, триазолопиримидины, пиримидинокси(тио)бензоаты и/или сульфониламинокарбонилтриазиолинон. Известно, что различные мутации в ферменте ALS (также известном как синтаза ацетогидроксикислот, AHAS) придают устойчивость к различным гербицидам и группам гербицидов, как описано, например, в Tranel and Wright (2002), а также в патентах США №№ 5605011, 5378824, 5141870 и 5013659. Получение сульфонилкарбамид-устойчивых растений и имидазолинон-устойчивых растений описывают в патентах США №№ 5605011; 5013659; 5141870; 5767361; 5731180; 5304732; 4761373; 5331107; 5928937 и 5378824; и международной патентной публикации № WO96/33270. Другие имидазолинон-устойчивые растения также описывают, например, в WO2004/040012, WO2004/106529, WO2005/020673, WO2005/093093, WO2006/007373, WO2006/015376, WO2006/024351 и WO2006/060634. Дополнительные сульфонилкарбамид-и имидазолинон-устойчивые растения также описывают, например, в WO07/024782 и патентной заявке США № 61/288958.

Другие растения хлопка, устойчивые к имидазолинону и/или сульфонилкарбамиду, можно получать посредством индуцированного мутагенеза, селекции в культурах клеток в присутствии гербицида или мутационной селекции, как описано, например, для сои в патенте США № 5084082, для риса - в WO97/41218, для сахарной свеклы - в патентах США № 5773702 и WO99/057965, для салата-латука - в патенте США № 5198599 или для подсолнечника - в WO01/065922.

Дополнительные интересные продукты экспрессии придают растению хлопка устойчивость к насекомым, т.е. устойчивость к поражению конкретными насекомыми-мишенями. Такие растения можно получать посредством генетической трансформации или селекции растений, содержащих мутацию, обеспечивающую такую устойчивость к насекомым.

Устойчивые к насекомым растения включают любое растение, содержащее по меньшей мере один трансген, содержащий кодирующую последовательность, кодирующую:

1) инсектицидный кристаллический белок из *Bacillus thuringiensis* или его инсектицидную часть, такой как инсектицидные кристаллические белки, указанные в Crickmore et al. (1998), обновление в Crickmore et al. (2005) по номенклатуре токсинов *Bacillus thuringiensis*, он-лайн на http://www.lifesci.Sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/, или их инсектицидные части, например белки из классов белков Cry Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1F, Cry2Ab, Cry3Aa или Cry3Bb или их инсектицидные части (например, EP 1999141 и WO2007/107302), или такие белки, кодируемые синтети-

ческими генами, например, как описано в патентной заявке США № 12/249016; или

2) кристаллический белок из *Bacillus thuringiensis* или его часть, являющийся инсектицидным в присутствии другого второго кристаллического белка из *Bacillus thuringiensis* или его части, такой как бинарный токсин, полученный из кристаллических белков Cry34 и Cry35 (Moellenbeck et al. 2001; Schnepf et al. 2006), или бинарный токсин, полученный из белков Cry1A или Cry1F и белков Cry2Aa или Cry2Aa или Cry2Ae (патентная заявка США № 12/214022 и EP 080107915); или

3) гибридный инсектицидный белок, содержащий части различных инсектицидных кристаллических белков из *Bacillus thuringiensis*, таких как гибридный белков по п.1) выше или гибридный белков по п.2) выше, например белок Cry1A.105, продуцируемый объектом кукурузы MON89034 (WO2007/027777); или

4) белок по любому из пп.1)-3) выше, где некоторые аминокислоты, в частности от 1 до 10, заменяют другой аминокислотой для получения более высокой инсектицидной активности по отношению к видам насекомых-мишеней, и/или для расширения диапазона поражаемых видов насекомых-мишеней, и/или по причине изменений, вносимых в кодирующую ДНК при клонировании или трансформации, такой как белок Cry3B1 в объектах кукурузы MON863 или MON88017 или белок Cry3A в объекте кукурузы MIR604; или

5) инсектицидный секретируемый белок из *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus cereus* или его инсектицидная часть, такой как вегетативные инсектицидные белки (VIP), представленные в http://www.lifesci.Sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, например белки из класса белков VIP3Aa; или

6) секретируемый белок из *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus cereus*, являющийся инсектицидным в присутствии второго секретируемого белка из *Bacillus thuringiensis* или *B. cereus*, такой как бинарный токсин, полученный из белков VIP1A и VIP2A (WO94/21795); или

7) гибридный инсектицидный белок, содержащий части из различных секретируемых белков из *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus cereus*, такой как гибридный белков по п.1) выше или гибридный белков по п.2) выше; или

8) белок по любому из пп.5)-7) выше, где некоторые аминокислоты, в частности от 1 до 10, заменяют другой аминокислотой для получения более высокой инсектицидной активности по отношению к видам насекомых-мишеней, и/или для расширения диапазона поражаемых видов насекомых-мишеней, и/или по причине изменений, вносимых в кодирующую ДНК при клонировании или трансформации (но все равно кодирующую инсектицидный белок), такой как белок VIP3Aa в объекте хлопка COT102; или

9) секретируемый белок из *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus cereus*, являющийся инсектицидным в присутствии кристаллического белка из *Bacillus thuringiensis*, такой как бинарный токсин, полученный из VIP3 и Cry1A или Cry1F (патентная заявка США №№ 61/126083 и 61/195019), или бинарный токсин, полученный из белка VIP3 и белков Cry2Aa или Cry2Ab или Cry2Ae (патентная заявка США № 12/214022 и EP 080107915);

10) белок по п.9), где некоторые аминокислоты, в частности от 1 до 10, заменяют другой аминокислотой для получения более высокой инсектицидной активности по отношению к видам насекомых-мишеней, и/или для расширения диапазона поражаемых видов насекомых-мишеней, и/или по причине изменений, вносимых в кодирующую ДНК при клонировании или трансформации (но все равно кодирующую инсектицидный белок).

Также включены устойчивые к насекомым трансгенные растения, содержащие комбинацию генов, кодирующих белки любого из указанных выше классов от 1 до 10. В одном из вариантов осуществления устойчивое к насекомым растение содержит несколько трансгенов, кодирующих белок любого из указанных выше классов от 1 до 10, для расширения диапазона поражаемых видов насекомых-мишеней при использовании различных белков, направленных против различных видов насекомых-мишеней, или для задержки развития устойчивости к насекомым у растений с использованием различных белков, инсектицидных по отношению к тем же видам насекомых-мишеней, но имеющих другой механизм действия, такой как связывание с другими участками связывания рецептора у насекомого.

Устойчивые к насекомым растения дополнительно включают растения, содержащие по меньшей мере один трансген, содержащий последовательность, приводящую после экспрессии к образованию двухцепочечной РНК, которая после потребления насекомым-вредителем растений ингибирует рост этого насекомого-вредителя, как описано, например, в WO2007/080126, WO2006/129204, WO2007/074405, WO2007/080127 и WO2007/035650.

Дополнительные признаки придают устойчивость к абиотическим стрессам. Растения с такой устойчивостью можно получать посредством генетической трансформации или селекции растений, содержащих мутацию, обеспечивающую такую устойчивость к стрессу. Особенно пригодные устойчивые к стрессу растения включают:

1) растения, содержащие трансген, способный снижать экспрессию и/или активность гена поли(ДЦФ-рибоза)полимеразы (PARP) в растительных клетках или растениях, как описано в WO00/04173, WO/2006/045633, EP 040779845 или EP 060098365.

2) растения, содержащие повышающий устойчивость к стрессу трансген, способный снижать экс-

прессию и/или активность генов, кодирующих PARC, в растениях или растительных клетках, как описано, например, в WO2004/090140.

3) растения, содержащие повышающий устойчивость к стрессу трансген, кодирующий функциональный в растениях фермент реутилизационного пути синтеза никотинамидадениндинуклеотида, включая никотинамидазу, никотинат-фосфорибозилтрансферазу, моонуклеотидаденилтрансферазу никотиновой кислоты, никотинамидадениндинуклеотидсинтазу или никотинамидфосфорибозилтрансферазу, как описано, например, в EP040776247, WO2006/133827, РСТ/EP07/002433, EP1999263 или WO2007/107326.

Растения или культивары растений (которые можно получать способами биотехнологии растений, такими как генетическая инженерия), которые также можно обрабатывать по изобретению, являются растениями, такими как растения хлопка, с измененными характеристиками волокон. Такие растения можно получать посредством генетической трансформации или селекции растений, содержащих мутацию, обеспечивающую такие измененные характеристики волокон, и они включают:

a) растения, такие как растения хлопка, содержащие измененную форму генов целлюлозосинтазы, как описано в WO98/00549;

b) растения, такие как растения хлопка, содержащие измененную форму gsw2- или gsw3-гомологичных нуклеиновых кислот, как описано в WO2004/053219;

c) растения, такие как растения хлопка, с повышенной экспрессией сахарозо-фосфатсинтазы, как описано в WO01/17333;

d) растения, такие как растения хлопка, с повышенной экспрессией сахарозосинтазы, как описано в WO02/45485;

e) растения, такие как растения хлопка, где изменен временной режим транспорта через плазмодесмы в основании клетки, например, посредством негативной регуляции волокно-селективной β -1,3-глюканазы, как описано в WO2005/017157, или как описано в EP080755143 или патентной заявке США № 61/128938;

f) растения, такие как растения хлопка, имеющие волокна с измененной реакционной способностью, например, благодаря экспрессии гена N-ацетилглюкозаминтрансферазы, включая podC, и генов хитинсинтазы, как описано в WO2006/136351;

Трансформированные растительные клетки и растения, полученные способами, представленными в настоящем описании, далее можно использовать в способах селекции, хорошо известных в этой области, таких как скрещивание, самоопыление и обратное скрещивание. Программы селекции могут включать скрещивание для получения поколения F1 (первого поколения гибридов), а затем нескольких поколений посредством самоопыления (поколения F2, F3 и т.д.). Программа селекции также может включать этапы обратного скрещивания (BC), при этом потомка скрещивают с одной из родительских линий, обозначаемой как рекуррентный родитель.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения растения, содержащего химерный ген, представленный в настоящем описании, включающему этап скрещивания растения хлопка, представленного в настоящем описании, с другим растением или самим собой и селекции потомка, содержащего указанный химерный ген.

Трансформированные растительные клетки и растения, полученные способами, представленными в настоящем описании, дополнительно можно использовать в последующей трансформации, например, для встраивания дополнительного химерного гена.

Растения или семя, содержащее химерный ген, представленный в настоящем описании, или полученное способами, представленными в настоящем описании, дополнительно можно обрабатывать хлопковыми гербицидами, такими как диурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралин, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, глифосат, норфлуразон, пендиметалин, пиритиобакнатрия, трифлорисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флумиоксазин, тидиазурон; хлопковые инсектициды, такими как ацефат, алдикарб, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, ацетамиприд, эмамектина бензоат, имидаклоприд, индоксакарб, лямбда-цигалотрин, спиносад, тиодикарб, гамма-цигалотрин, спиромезифен, пиридадил, флониамид, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, бета-цифлутрин, спиротетрамат, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, динетофуран, флубендиамид, циазипир, спиносад, спинотрам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тиодикарб, авермектин, флониамид, пиридадил, спиромезифен, сульфоксафлор; и хлопковые фунгициды, такие как азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлорталонил, медь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, фенамидон, флуазилам, флуопирам, флуоксастробин, флукаспироксад, ипродион, изопиразам, изотианил, манкозеп, манеб, метоминостробин, пентиопирад, пикоксистробин, пропинеб, протиоконазол, пираклостробин, хинтозин, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, трифлористробин.

Список последовательностей, содержащийся в файле под названием "BCS13-2019_ST25.txt", составляющем 30 килобайт (размер, измеряемый в Microsoft Windows®), содержит 8 последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 8, поданных, таким образом, посредством электронной подачи и вклю-

ченных в настоящее описание в качестве ссылок.

На чертежах представлено.

Фиг. 1 - зимограмма нативного электрофореза в ПААГ экстракта с активностью МХЕ. Неочищенный экстракт (А) или преципитат сульфата аммония (ASP) (В) подвергали нативному электрофорезу в ПААГ. Одну дорожку окрашивали кумасси синим (СВ). Три дорожки подвергнутых электрофорезу гелей вырезали и дважды промывали 0,3-М цитратным буфером (рН 6,3) в течение 15 мин. Определяли активности ферментов, накладывая дорожку на бумагу, пропитанную MLG и XXXG-SR (конъюгатом сульфородамина и гептасахарида ксилоглюкана (Xyl3.Glc4)) (М), ХуG (ксилоглюканом) и XXXG-SR (Х) или только XXXG-SR (С). Светлые полосы на темном фоне свидетельствуют о трансглюкозилировании между полисахаридом и олигосахаридом; в случае (С) используемым полисахаридом являлась целлюлоза из самой бумаги.

Фиг. 2 - бумага для дот-блоттинга, подтверждающая активность СХЕ. А) Три полосы индикаторной бумаги нагружали (по 3 мкл каждая, 8 пятен) серией 2-кратных разведений фермента ASP в цитратном буфере (0,3 М, рН 6,3). Полоски инкубировали во влажных условиях в течение 1 ч, затем сушили при комнатной температуре. Полоски промывали в этаноле/муравьиной кислоте/воде (EFW) и фотографировали. В) Полоски промывали в 6 М NaOH при 37°C в течение ночи, промывали водой, сушили и снова фотографировали. При промывке бумага уменьшалась в размере. Кругами показан оставшийся крепко связавшийся продукт эндотрансглюкозилазы, присущий трансгликозилированию целлюлозы в XXXG. С=СХ; М=МХЕ; Х=ХЕТ.

Фиг. 3 - природная целлюлоза в качестве донора для НТГ. Культуру клеток в состоянии покоя и зрелые побеги промывали в 75% EtOH до удаления хлорофилла и сушили. Часть AIR (нерастворимого в спирте осадка) инкубировали в 6 М NaOH при 37°C в течение ночи, затем промывали водой для удаления щелочи, лиофилизировали и хранили. Каждый субстрат (10 мг) регидратировали в течение ночи и перед анализом удаляли избыток жидкости. Твердый субстрат смешивали с [³H]XXXGol (восстановленным XXXG (т.е. Ху13.Glc3.сорбитом)) (2 кБк), ASP и цитратным буфером буфер (0,3 М, рН 6,3, 97 мкл). Через 2 ч реакцию останавливали муравьиной кислотой (FA) (30 мкл) и твердые вещества промывали водой до удаления оставшегося свободного [³H]XXXGOL. Твердые вещества (в 1 мл воды) переносили в сцинтилляционные флаконы и инкубировали со сцинтиллятором в течение ночи до анализа ³H. Каждый образец тестировали в трех повторениях, представлено ±SD. * n=1.

Фиг. 4 - потенциал активностей ковалентного связывания целлюлозных микрофибрилл.

Фиг. 5 - скорректированная радиоактивность (импульсы/мин в случае МХЕ и ХЕТ, импульсы/мин/6 в случае СХЕ) фракций 1-20, имеющих три активности эндотрансглюкозилаз (ХЕТ (столбики, заштрихованные по диагонали), МХЕ (черные столбики), СХЕ (белые столбики)) после изоэлектрофокусирования осажденных сульфатом аммония белков Equisetum.

Фиг. 6 - временная шкала активности ХЕТ, МХЕ и СХЕ белка НТГ, экспрессируемого в Pichia. Активность ХЕТ указана ромбами, активность МХЕ указана квадратами, и активность СХЕ указана треугольниками. Ось Х: время (мин); ось Y: включенная радиоактивность (импульсы/мин).

Фиг. 7 - специфичность рекомбинантного НТГ к акцепторному субстрату в анализе, в котором в качестве донора использовали глюкан со смешанными связями ячменя. Процент включения представлен для потенциальных акцепторных субстратов (все ³H-меченые) (1→4)-β-манногексит (1), целлогексит (2), (1→4)-β-галактогексит (3), (1→4)-α-галактуроногексит (4), XXLGol (5), GGXXXGol (6), XXXGol (7), GXXGol (8), мальтогексит (9), полученные с помощью целлюлазы гептасахарида и октасахарида MLG (10), (1→4)-β-ксилогексит (11), полученные с помощью лихеназы олигосахарида MLG от гепта- до декасахаридов (12), полученный с помощью лихеназы октасахарида MLG (13), полученный с помощью лихеназы гептасахарида MLG (14) и ламинаритетрит (15). Номенклатура аббревиатур ксилоглюкановых олигосахаридов (XXLGol, GGXXXGol, XXXGol, GXXGol) является такой, как описано в Fry et al. (1993).

Фиг. 8 - выравнивание нуклеотидных (А) и аминокислотных (В) последовательностей SEQ ID NO: 1, 5 и 7 и SEQ ID NO: 2, 6 и 8 соответственно.

Фиг. 9 - временная шкала активности ХЕТ, МХЕ и СХЕ белка НТГ, экспрессируемого в Pichia, в присутствии и отсутствие BSA. Активность ХЕТ с BSA: белые квадраты; активность ХЕТ без BSA: черные квадраты; активность МХЕ с BSA: белые треугольники; активность МХЕ без BSA: черные треугольники; активность СХЕ с BSA: белые круги; активность СХЕ без BSA: черные круги. Ось Х: время инкубации (ч); ось Y: включенная ³H-радиоактивность (импульсы/мин/кБк восполняемого субстрата).

Фиг. 10 - катализируемое НТГ трансгликозилирование с использованием [³H]XXXGol в качестве акцепторного субстрата и различных донорных субстратов, включая глюкан со смешанными связями (MLG) (крестики); ксилоглюкан (треугольники) водорастворимый ацетат целлюлозы (WSCA) (ромбы); немелованную бумагу (PP) (черные квадраты); предварительно обработанную щелочью бумагу (AP) (черные круги); предварительно обработанную щелочью бумагу + бычий сывороточный альбумин (AP+BSA) (белые круги), немелованную бумагу + бычий сывороточный альбумин (PP+BSA) (белые квадраты). Ось Х: время инкубации (ч); ось Y: включенная ³H-радиоактивность (Бк/кБк восполняемого субстрата).

Фиг. 11 - трансгликозилирование с использованием [^3H]XXXGol (черные символы) или [^3H]целлотетрита (GGGGol) (белые символы) в качестве акцепторов и различных донорных субстратов, включая предварительно обработанную щелочью бумагу + BSA (AP+BSA) (ромбы; черные ромбы - с XXXGol, белые ромбы - с GGGGol), глюкан со смешанными связями (MLG) (треугольники; черные треугольники - с XXXGol, белые треугольники - с GGGGol) и ксилоглюкан (круги; черные круги - с XXXGol, белые круги - с GGGGol). Ось X: время инкубации (ч); ось Y: включенная ^3H -радиоактивность (Бк/кБк восполняемого субстрата).

Фиг. 12 - скорости катализируемого HTG трансгликозилирования с использованием MLG (серые столбики) или ксилоглюкана (черные столбики) в качестве донорного субстрата и различных ^3H -олигосахаридов в качестве потенциальных акцепторов. Скорость реакции с использованием XXXGol принимали за 100%. А, В, и С представляют собой три независимых эксперимента. В экспериментах В и С использовали HTG, очищенный с помощью аффинной хроматографии. В эксперименте С в качестве донора использовали только MLG. 1: XXXGol; 2: GXXGol; 3: GGXXXGol; 4: XXLGol; 5: XLLGol; 6: Cell4-ol; 7: Man6-ol; 8: Xyl6-ol; 9: MLGO-ol A; 10: MLGO-ol B; 11: MLGO-ol C; 12: Cell6-ol; 13: MLGO-ol D; 14: MLGO-ol E; 15: MLGO-ol F; 16: Lam4-ol; 17: Gal6-ol; 18: GalA6-ol; 19: Malt6-ol. MLGO-ol A-F не идентифицировали в отдельности, они представляли собой олигосахариды MLG ячменя от гепта- до декасахаридов, расщепленные лихеназой (А-С), или целлюлозу (D-F).

На всем протяжении настоящей заявки делают ссылки на следующие последовательности:

SEQ ID NO: 1: нуклеотидная последовательность HTG *Equisetum fluviatile*,

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 3: нуклеотидная последовательность слитого белка HTG, используемого для экспрессии в *Pichia pastoris*,

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO: 3,

SEQ ID NO: 5: нуклеотидная последовательность HTG *Equisetum hyemale*,

SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO: 5,

SEQ ID NO: 7: нуклеотидная последовательность HTG *Equisetum diffusum*,

SEQ ID NO: 8: аминокислотная последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO: 7.

С помощью примеров иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1. Материалы и способы.

1.1. Общие сведения.

Если не указано иначе, осуществляемые этапы клонирования, такие как, например, расщепление рестриктазами, электрофорез в агарозном геле, очистка фрагментов ДНК, соединение фрагментов ДНК, трансформация бактериальных или дрожжевых клеток, выращивание бактерий или дрожжей и анализ последовательности рекомбинантной ДНК, осуществляли, как описано в Sambrook (2000). Секвенирование молекул рекомбинантной ДНК осуществляли с использованием лазерного флуоресцентного ДНК-секвенатора ABI по способу Сэнгера.

1.2. Выделение ферментов из растительного материала.

Сырые смеси ферментов выделяли из свежей растительной ткани в CaCl_2 (10 мМ), янтарной кислоте (0,3 М) и аскорбиновой кислоте (20 мМ), полученные в свежем виде с pH 5,5. Поликлад АТ (3% мас./об.) добавляли к смеси с фенолами. Свежую ткань гомогенизировали в пищевом блендере с 5 мл указанного выше экстрагента на 1 г массы сырой ткани. Ткань и экстрагент перемешивали на льду в течение 2,5 ч. Экстракт фильтровали через два слоя Miracloth и центрифугировали в центрифуге Sorvall Evolution RC (10 мин, 10000 об/мин, 4°C). Супернатант собирали и аликвотировали, затем замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

1.3. Изоэлектрофокусирование (IEF) Rotofor.

Bio-Rad Rotofor Cell собирали и подготавливали по инструкциям производителя. Rotofor использовали с программным обеспечением BioRad PowerPac HV. Амфолиты смешивали с водой и смесью маркеров, содержащей фикоцианин, гемоглобина А и С и цитохром с, или диализированным образцом белка. Разделение осуществляли при постоянной мощности 10 Вт до стабилизации напряжения и собирали фракции по инструкциям производителя. Для измерения pH фракций использовали pH-метр Sartorius PB-11. Также анализировали активность трансглюкозилаз.

1.4. Флуоресцентный анализ трансглюкозилирования.

Получение бумаги для анализа.

Бумагу для дот-блоттинга, или индикаторную бумагу, получали согласно Fry (1997). Индикаторную бумагу получали с использованием хроматографической бумаги Whatman 1CHR. Получали ХЕТ-индикаторную бумагу, погружая ее в 1,0% ХуГ, высушивая, затем погружая в 5 мкМ XXXG-SR (конъюгат XXXG и сульфородамина (SR)) в 75% ацетоне или 75% этаноле. Другую бумагу погружали в 1,0% MLG, сушили, затем погружали в XXXG-SR для получения МХЕ-индикаторной бумаги. Получали контрольную бумагу, не содержащую иной полисахаридный донорный субстрат, кроме самой бумаги, включающую акцепторный субстрат. Конечная концентрация акцепторного субстрата для всей индикаторной бумаги составляла $\sim 125 \text{ пмоль/см}^2$.

Анализ индикаторной бумаги.

Индикаторную бумагу, вырезанную по размеру, использовали двумя способами: растворы ферментов наносили на бумагу маленькими точками (дот-блот-анализ) или бумагу приводили в тесный контакт с гелями, подвергнутыми нативному электрофорезу в ПААГ (анализ зимограммы). Образец для анализа инкубировали во влажных условиях между двумя запечатанными стеклянными пластинами. Затем бумагу сушили при комнатной температуре и промывали в этаноле:FA:воде (EFW) 1:1:1 в течение 1 ч. Полоски сушили, зажимали под прессом в течение ночи и фотографировали с использованием UVP Multi Doc-It Digital Imaging System. О положительном трансглюкозилировании свидетельствовала флуоресценция, возбуждаемая под воздействием ультрафиолета при 254 нм.

Флуоресцентный дот-блот-анализ.

На сухую индикаторную бумагу наносили аликвоты раствора активного фермента [как правило, в сукцинатном буфере, pH 5,5, содержащем 10 mM CaCl₂] по 3 мкл в виде пятен (с расстоянием от центра до центра 9 мм, т.е. в формате 96-луночного планшета).

Быстро помещали бумагу между 2 листами политена или стекла, зажимали под прессом (телефонным справочником) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1-24 ч. Пятна фермента должны оставаться влажными. Для достижения этого полезно размещать пятна раствора фермента (или контрольного буфера) по всей площади бумаги, не заходя за края.

Позволяли бумаге сохнуть на открытом воздухе, затем промывали в полиэтиленовом контейнере, содержащем этанол:90% муравьиную кислоту:воду (EFW) 1:1:1 или 10%-ный водный раствор муравьиной кислоты с осторожным встряхиванием в течение 1 ч.

Если есть какие-либо вопросы о том, что также могут образовываться продукты ХЕТ или МХЕ (несмотря на то, что не добавляли умышленно соответствующие донорные субстраты для этих активностей), может быть полезным промывать бумагу в 6 M NaOH (с очень осторожным встряхиванием, т.к. бумага становится очень хрупкой).

Тщательно промывали в водопроводной воде.

Сушили.

Наблюдали под УФ-освещением (254 или 310 нм) или светом, генерируемым зеленым лазером, и регистрировали оранжевую флуоресценцию пятен продукта реакции CXE.

1.5. Анализы целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы (CXE).

Хроматографическую бумагу Whatman 1CHR (10-35 мг; предварительно обработанную*) инкубировали с экстрактом или фракцией фермента, [³H]XXXGol (2 кБк), и цитратным буфером (pH 6,3, конечный объем 100 мкл) в течение установленного времени, как правило, 0-24 ч. Реакцию останавливали добавлением 90% муравьиной кислоты (30 мкл), затем бумагу промывали посредством повторяемого добавления воды, центрифугирования и удаления супернатанта, пока супернатант не перестанет содержать радиоактивную метку. Как правило, в случае целлюлозы необходимо приблизительно шесть промывок для удаления растворимой радиоактивной метки. Оставшуюся целлюлозу суспендировали в 0,5 мл воды, переносили в сцинтилляционный флакон с 5 мл смешивающегося с водой сцинтиллятора и анализировали на 47 радиоактивность посредством сцинтилляционных измерений.

*Предварительная обработка бумаги: добавить 3 г бумаги к 45 мл 6 M NaOH, инкубировать при 37°C в течение ночи с осторожным встряхиванием, промывать в воде до почти нейтрального состояния, затем сукцинатным буфером (pH 5,5), затем большим количеством воды; в конце концов, сушить бумагу.

6.6. Нативный электрофорез в ПААГ.

Нативные полиакриламидные гели получали аналогично ПААГ с SDS, но с некоторыми отличиями. Получали концентрирующий гель с концентрацией 4,3% акриламида с трис-(гидроксиметил)аминометаном (Tris) (67 mM, pH 6,7 с H₃PO₄). Концентрация разделяющего геля составляла 7,5% акриламида с Tris (376 mM, pH 8,9). Подвижный буфер содержал Tris (5 mM) и глицин (38 mM). Гели подвергали электрофорезу при 6°C в течение 25 мин при 20 мА, затем в течение 3 ч при 40 мА.

1.7. Растворение целлюлозы в DMA/LiCl.

Этот способ адаптировали из Gurjanov et al. (2008) с модификациями. Активировали молекулярное сито (4 Å) (100°C, 3 ч). Диметилацетамид (DMA) сушили над ситом в течение по меньшей мере 5 дней. LiCl (8 г) сушили (180°C, 4 ч) и растворяли в сухом DMA (100 мл). Куски Whatman 1CHR увлажняли водой в течение 1 ч, затем фильтровали на нейлоновой сетке. Куски бумаги промывали в ацетоне, затем инкубировали в ацетоне в течение 1 ч. Куски снова отфильтровывали с использованием нейлоновой сетки, промывали в DMA и инкубировали в течение ночи в сухом DMA. DMA удаляли и заменяли 8% LiCl в DMA таким образом, что бумага составляла 1% (мас./об.). Бумагу растворяли посредством перемешивания при комнатной температуре. Для снижения вязкости раствора целлюлозы добавляли равный объем сухого DMA. Раствор медленно добавляли с помощью перистальтического насоса к быстро перемешиваемому 6 M NaOH, в котором осаждалась целлюлоза, но ожидали, что гемицеллюлозы из бумаги останутся в растворе.

Пример 2. Целлюлоза в качестве донорного субстрата для МХЕ.

При поиске ферментов с активностью трансглюкозилазы, в частности МХЕ (MLG:ксилоглюкан-

эндотрансглюкозилазы) и ХЕТ (ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы), наблюдали, что ферменты из *Equisetum fluviatile*, частично очищенные с использованием осаждения сульфатом аммония и изоэлектрофокусирования (Rotofog), проявляли активность МХЕ и/или активность ХЕТ. В отрицательном контроле на полоске бумаги, обработанной XXXG-SR (конъюгатом сульфородамина и XXXG (гептасахарида ксилоглюкана)), но без добавления полисахаридного донорного субстрата, ожидали отсутствие остаточной флуоресценции, свидетельствующей о ферментативной активности (фиг. 1). Однако полоса, соответствующая предполагаемой активности трансглюкозилазы, отображалась на всех трех индикаторных бумагах для ХЕТ (ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы), МХЕ и контроля. Т.к. целлюлоза являлась единственным известным полисахаридом, присутствующим в контролях, исследовали возможность действия β -(1 $\rightarrow$ 4)-глюкана в качестве донорного субстрата в реакции трансглюкозилирования.

Индикаторная бумага, пропитанная XXXG-SR.

Сначала наблюдение образования предполагаемого продукта трансглюкозилирования без донорного субстрата (иного, чем бумага) повторяли в немного другом эксперименте. Частично очищенный фермент, имеющий активность МХЕ и ХЕТ, наносили в виде серии разведений на три индикаторных бумаги, пропитанных MLG (1,3;1,4- β -d-глюканом со смешанными связями), ХуG (ксилоглюканом) или без добавления полисахарида и XXXG-SR. Бумагу держали во влажных условиях в течение 1 ч, затем промывали от XXXG-SR и фотографировали под УФ-освещением для демонстрации флуоресцентного продукта трансглюкозилирования (фиг. 2a). Затем три бумаги инкубировали в 6 М NaOH для удаления гемицеллюлоз из бумаги и снова фотографировали (фиг. 2 b).

Фактически, в этом эксперименте воспроизводили исходное наблюдение того, что бумага в отдельности без добавления донорного субстрата может являться субстратом для трансглюкозилирования. Во всех из трех индикаторных бумаг наблюдали продукт трансглюкозилирования, о чем свидетельствуют флуоресцентные пятна, даже когда фермент разбавляли в буфере в 16 раз. Гемицеллюлозы, включая продукты МХЕ и ХЕТ, вымывались бы в 6 М NaOH. Как и ожидали, тестовые полоски, соответствующие МХЕ и ХЕТ, содержали значимо меньше продукта, оставшегося на бумаге, возможно, вообще не содержали. Контрольная бумага удерживала продукт после промывки NaOH, хотя его оставалось меньше. Целлюлоза и некоторые маннаны не растворяются в водном растворе NaOH (Moreira and Filho, 2008), и они являлись вероятными кандидатами на роль донорного субстрата.

Использовали хроматографическую бумагу Whatman 1CHR. Она сделана из хлопка, но нельзя получить информацию об обработке материала в процессе получения бумаги. Наиболее распространенным присутствующим полисахаридом, который может являться донором энергии, необходимой для реакции трансглюкозилирования, несомненно, являлась целлюлоза. После анализа посредством гидролиза TFA и Driselase® (препарата фермента грибов, содержащего экзо- и эндогидралазы полисахаридов, включая целлюлазу, пектиназу, бета-ксиланазу и бета-маннаназу) исключали другие полисахариды на роль донорных субстратов.

В целом, при гидролизе TFA и Driselase наблюдали, что Whatman 1CHR состоит, главным образом, из глюкозы, более вероятно - из целлюлозы. При гидролизе TFA (трифторуксусной кислотой) также наблюдали следы ксилозы. Аналогично, при расщеплении Driselase® получали ксилозу в качестве наиболее распространенного сахара после глюкозы и целлобиозы. Кроме того, при расщеплении не наблюдали следов изопримверозы, что свидетельствует об отсутствии ХуG. Некоторые из гликопротеинов, содержащих смесь Driselase®, аутолизировались при инкубации, давая следы глюкозы и маннозы.

Анализ целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы с использованием радиоактивной метки.

Для анализа новой активности трансглюкозилазы с использованием целлюлозы в качестве донорного субстрата, предварительно обозначенной как "CXE", использовали радиоактивный акцептор [3 H]XXXGol (восстановленный XXXG, Ху13.Glc3.сорбит).

Природная целлюлоза в качестве донора.

Для определения того, относится ли эта активность к росту растений *Equisetum*, в качестве потенциального донорного субстрата использовали растительный материал. Сначала получали нерастворимый в спирте остаток (AIR) клеток каллюсной культуры и стеблей зрелых растений. Остаток инкубировали в 6 М NaOH для удаления гемицеллюлоз, некоторые из которых также могут являться донорными субстратами. AIR и промытый в NaOH остаток тестировали в качестве потенциальных донорных субстратов (фиг. 3).

Как показано ранее, бумага Whatman может являться донорным субстратом для реакции трансглюкозилирования. Клетки культуры богаты ХуG, но не MLG (фиг. 1), и ожидали, что они будут поставлять донорный субстрат для ХЕТ. Зрелые побеги, богатые MLG и ХуG, содержали субстраты МХЕ, ХЕТ и CXE. Однако, что примечательно, все образцы, промытые NaOH, включали больше акцепторного субстрата, чем непромытая бумага или AIR. Если с помощью 6 М NaOH удаляют все гемицеллюлозы, покрывающие целлюлозные микрофибриллы, и если с помощью него можно снижать кристалличность микрофибрилл, то возможно, что целлюлоза являлась более подходящим субстратом для доминантной трансглюкозилазы, чем любой другой субстрат.

Солюбилизация и восстановление целлюлозы и продукта CXE.

Предполагают, что гемицеллюлозы могут быть захваченными внутри аморфных областей целлюлозных микрофибрилл (Rose and Bennet, 1999). Такие "захваченные" гемицеллюлозы могут быть более сильно соединены с целлюлозой, оставаясь связанными с микрофибриллами в теплой щелочи. Можно утверждать, что эти гипотетические гемицеллюлозы являются настоящим донорным субстратом для наблюдаемого трансгликозилирования с бумагой.

Другим способом подтверждения того, что $[^3\text{H}]\text{XXXGol}$ являлся ковалентно связанным с целлюлозой, являлось растворение целлюлозного продукта. Если целлюлозные микрофибриллы восстанавливали в щелочи, гемицеллюлозы более не могли быть захваченными внутри микрофибриллы и оставались бы растворимыми.

Целлюлозу солибилизировали с использованием хлорида лития (LiCl) в диметилацетамиде (DMA). Продукт CXE растворяли в растворе 8% LiCl в DMA. Вязкий раствор медленно переносили в большой объем 6 М NaOH, в котором целлюлоза переосаждалась. Твердую целлюлозу отделяли от супернатанта и в каждой фракции определяли радиоактивный продукт (табл. 1).

Таблица 1

Восстановление продукта CXE

Растворимый в 6 М NaOH	Осажденная целлюлоза
6500 импульсов/мин	14000 импульсов/мин

Продукт CXE (40 мг, полученный с использованием эксклюзионной хроматографии) вымачивали в воде в течение 1 ч с последующей заменой растворителя на ацетон. Бумагу вымачивали в ацетоне в течение 1 ч, затем заменяли DMA, не содержащим H_2O (над молекулярным ситом Sigma, 4 Å, в течение 5 дней), и вращали в течение 16 ч. Удаляли DMA и инкубировали продукт CXE в сухом DMA (4 мл) с 8% (мас./об.) LiCl в течение 16 ч. Затем добавляли дополнительные 4 мл DMA для снижения вязкости. Медленно добавляли раствор целлюлозы к перемешиваемому 6 М NaOH (80 мл) с помощью перистальтического насоса со скоростью 3,2 мл/ч. Полученную смесь перемешивали в течение 48 ч. Часть смеси удаляли и центрифугировали. Супернатант отделяли от осаждающих средств; оба из них нейтрализовали с помощью HOAc и осуществляли сцинтилляционные измерения. Регистрировали количество импульсов/мин всего супернатанта и всех осадков.

Т.к. основная часть ^3H -продукта осаждалась, целлюлоза фактически может являться настоящим субстратом для реакции трансгликозилирования с бумагой. Основная часть ^3H следовала ожидаемому профилю осаждения целлюлозы в 6 М NaOH после растворения в LiCl и DMA. Хотя измеряемое соотношение трития в осадке и трития в супернатанте составляло 2,2:1, это соотношение могло являться более высоким с учетом Бк, т.к. твердые частицы подсчитывают с меньшей эффективностью, чем раствор.

Радиоактивность, оставшаяся в растворе, могла соответствовать продуктам распада XXXGol или присоединенным к XXXGol коротким фрагментам β -(1→4)-глюкана с повышенной растворимостью благодаря XGO.

В целом, продукт CXE, растворенный с помощью LiCl в DMA, осаждался после восстановления целлюлозы в 6 М NaOH, что свидетельствует о том, что продукт трансгликозилирования не являлся гемицеллюлозой.

CXE является активностью частично очищенного HTG. Показано, что многочисленные белки во фракциях, осажденных сульфатом аммония, из Equisetum были способны к трансгликозилированию, некоторые из них проявляли активность ХЕТ, и по меньшей мере еще один фермент, МХЕ, способен использовать MLG или ХуГ в качестве донорного субстрата. Частично очищенные фракции экстракта Equisetum, полученные с использованием изоэлектрофокусирования (Rotofor) и имеющие две ферментативные активности МХЕ и ХЕТ, тестировали на их способность использовать целлюлозу в качестве донорного субстрата (табл. 2).

Таблица 2

Активность CXE из частично очищенного HTG

Фермент	Образовавшийся продукт (импульсы/мин)
pp МХЕ	1825
pp ХЕТ	18
ASP	1217
только буфер	13

Частично очищенную (pp) МХЕ, pp ХЕТ, ASP или только буфер (0,3 М цитрат, pH 6,3) инкубировали с $[^3\text{H}]\text{XXXGol}$ (2 кБк), цитратным буфером (до 100 мкл) и 10 мг бумаги Whatman 1CHR (необработанной) в течение 3,3 ч. Реакцию останавливали с помощью FA (30 мкл) и неиспользованные реагенты вымывали водой.

Бумагу (в 5 мл воды) инкубировали в сцинтилляторе и анализировали на ^3H .

Фракция частично очищенного HTG имела высокие уровни активности CXE, но только фракция с активностью ХЕТ не использовала целлюлозу в качестве донорного субстрата. Хотя фракция МХЕ не

являлась одним чистым белком, она содержала лишь несколько из них и была очень богата одним белком. В другом эксперименте серию очищенных с помощью Rotofor фракций, имеющих активность МХЕ, тестировали на активность СХЕ, и профили высокой активности СХЕ напрямую коррелировали с профилями высокой активности МХЕ и ХЕТ (фиг. 5). Этот фермент может являться относительно неспецифической трансглюкозилазой, способной использовать β -(1 $\rightarrow$ 4)-глюканы, независимо от их боковых цепей или других связей остова.

Характеристика активности МХЕ при использовании различных донорных и акцепторных субстратов.

Частично очищенная фракция МХЕ была способна использовать целлюлозу, MLG или ХуГ в качестве донорных субстратов с множеством акцепторных субстратов (табл. 3). Хотя MLG являлся более подходящим донорным субстратом, чем ХуГ, прямое сравнение степеней активности с использованием целлюлозы в качестве донорного субстрата являлось затруднительным. Концентрацию полисахарида в растворе, такого как MLG или ХуГ, нельзя сравнивать со схожей концентрацией твердого вещества в воде. Кроме того, тритий, включенный в твердый субстрат, такой как целлюлоза, или на нем, подсчитывали с более низкой эффективностью, чем тритий в растворе, что снижало возможность определения продукта СХЕ. Таким образом, активность МХЕ и ХЕТ можно сравнивать напрямую, но их можно лишь приблизительно сравнивать с активностью СХЕ.

Таблица 3

Характеристика активности МХЕ с использованием различных донорных и акцепторных субстратов. Относительная скорость реакции при использовании. Донор акцептора

	XXXGol	MLGO	Cello ₆ ol	XXLGol	XL ₂ LGol	XXFG
ХуГ	+++	±	±	+	+	
MLG	++++	+	+	++	+	+
Целлюлоза	++					
Лихенан	±					
Ламинарин	–					
Маннан	–					
GM	±					

(сокращения: GM = глюкоманнан, ХуГ = ксилоглюкан, MLGO = глюкановый олигосахарид со смешанными связями, Cello₆ol = целлогексит, XXFG = нонасахарид ксилоглюкана, имеющий композицию глюкоза₄.ксилоза₃.галактоза₁.фукоза₁).

Активность СХЕ.

Множество наблюдений приводят к подтверждению активности целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы.

Если ту же молекулу ксилоглюкана можно присоединять к двум соседним целлюлозным микрофибриллам, сами микрофибриллы могут ковалентно соединяться через промежуточный ХуГ (фиг. 4). Ковалентно связанная целлюлозная сеть может быть крепче, чем сеть на основе водородных связей.

Пример 3. Отслеживание и секвенирование генов, кодирующих белки НТГ с активностью СХЕ.

РНК получали из зрелого побега *E. fluviatile* с использованием реагента тризол (Invitrogen). С помощью набора для синтеза кДНК Evrogen Mint-Universal получали кДНК, нормировали ее с использованием набора Evrogen Trimmer kit и секвенировали с использованием технологии секвенирования 454. Исходные данные собирали в контиги и изотиги с использованием Newbler assembler версии 2.5, запатентованного Roche.

Для идентификации белков, имеющих активность СХЕ в *Equisetum*, использовали следующие подходы.

НТГ выделяли из неочищенного экстракта *E. fluviatile* с помощью четырех последовательных способов: дифференциального осаждения сульфатом аммония, гель-фильтрационной хроматографии, аффинной хроматографии с лектинами и изоэлектрофокусирования. Полученный образец разделяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, из которого вырезали одну преобладающую полосу, соответствующую ~30 кДа. Образец расщепляли трипсином и анализировали с помощью MALDI-ToF и LC-MS.

Для идентификации генов-мишеней транскриптом *Equisetum* подвергали трансляции и предполагаемые белки подвергали расщеплению трипсином *in silico*. Из фракции ~30 кДа, полученной из частично очищенной фракции IEF, два изотига, имевших наибольшие баллы, являлись частичными последовательностями генов белков, гомологичных ХТН. Полноразмерную последовательность двух генов-кандидатов идентифицировали с использованием результатов 5'- и 3'-RACE, показавших, что они являлись двумя частями одного и того же полноразмерного гена. Белок имел прогнозируемую pI 4,66 и прогнозируемую массу 29,5 кДа. Кодирующая последовательность представлена в SEQ ID NO: 1, а последо-

вательность кодируемого белка - в SEQ ID NO: 2. Прогнозировали, что аминокислоты 1-21 SEQ ID NO: 2 соответствуют сигнальному пептиду, а аминокислоты 22-280 соответствуют зрелому белку, и, таким образом, нуклеотиды 1-63 SEQ ID NO: 1 кодируют сигнальный пептид, а нуклеотиды 64-840 кодируют зрелый белок.

Последовательности SEQ ID NO: 1 и 2 использовали для поиска в общедоступной базе данных последовательностей. Обнаруживали два гомологичных гена, один из *Equisetum hyemale* (SEQ ID NO: 5 для кодирующей последовательности, имеющей 83% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и SEQ ID NO: 6 для кодируемого белка, имеющего 75% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2), и один из *Equisetum diffusum* (SEQ ID NO: 7 для кодирующей последовательности, имеющей 94% идентичности последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и SEQ ID NO: 8 для кодируемого белка, имеющего 91% идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей белков HTG *Equisetum* представлено на фиг. 8. Прогнозировали, что аминокислоты 1-25 SEQ ID NO: 6 соответствуют сигнальному пептиду, а аминокислоты 26-283 - зрелому белку, и что аминокислоты 1-28 SEQ ID NO: 8 соответствуют сигнальному пептиду, а аминокислоты 29-287 - зрелому белку. Таким образом, нуклеотиды 1-75 SEQ ID NO: 5 кодируют сигнальный пептид, а нуклеотиды 76-849 SEQ ID NO: 5 кодируют зрелый белок, и нуклеотиды 1-84 SEQ ID NO: 7 кодируют сигнальный пептид, а нуклеотиды 85-861 SEQ ID NO: 7 кодируют зрелый белок. Прогнозируемый зрелый белок, т.е. аминокислоты 26-283, SEQ ID NO: 6, имеет 79% идентичности последовательности по отношению к прогнозируемому зрелому белку, т.е. аминокислотам 22-280, SEQ ID NO: 2, в то время как прогнозируемый зрелый белок, т.е. аминокислоты 29-287, SEQ ID NO: 8 имеет 94% идентичности последовательности по отношению к зрелому белку, т.е. аминокислотам 22-280, SEQ ID NO: 2.

Пример 4. Активность MXE, XET и CXE рекомбинантного HTG, экспрессирующегося в *Pichia*.

Зрелый белок HTG *Equisetum fluviatile* (аминокислоты 22-280 SEQ ID NO: 2) экспрессировался с вектора pPICZaA после инсерции посредством трансформации в *Pichia pastoris* (SMD1168H) в виде слитого белка с сигнальной последовательностью α -фактора на N-конце и эпитопом с-тус и полигистидиновой меткой на C-конце. Кодирующая последовательность экспрессируемого слитого белка представлена в SEQ ID NO: 3, а кодируемый белок - в SEQ ID NO: 4. В SEQ ID NO: 4 аминокислоты 1-89 соответствуют сигнальной последовательности α -фактора, аминокислоты 92-350 соответствуют зрелому белку HTG, аминокислоты 353-362 - эпитопу с-тус, а аминокислоты 368-373 - полигистидиновой метке.

Трансформированные клетки *Pichia*, экспрессирующие слитый белок HTG, выращивали в жидкой среде для выращивания (90% (об./об.) низкосолевого LB, 1% (мас./об.) глицерина, 0,00004% (мас./об.) биотина, 100 мкг/мл зеоцина). Экспрессию стимулировали посредством центрифугирования и ресуспендирования культуры в среде для экспрессии (идентичной среде для выращивания, но с заменой глицерина 10% (об./об.) метанолом). Через 24 ч среду для культивирования собирали и анализировали на активность эндотрансглюкозилаз.

Анализ XET и MXE.

Активность XET анализировали с использованием реакционной смеси, состоящей из 10 мкл экстракта секретируемого *Pichia* фермента, 1 кБк [3 H]XXXGol (высушенного для получения нулевого объема) и 10 мкл 1% донорного ксилотриозанового (ХуГ) полисахарида. Донорный, ферментативный и акцепторный компоненты находились в 50 мМ буфере MES, pH 6,0. Реакционную смесь инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 50% (мас./об.) муравьиной кислоты. Каждый образец загружали на фильтровальную бумагу Whatman 3MM, сушили и затем тщательно промывали проточной водой для удаления непрореагировавшего [3 H]XXXGol. Время, затраченное на удаление избытка [3 H]XXXGol, определяли посредством анализа квадрата бумаги отрицательного контроля, промываемого в тех же условиях, что и бумагу, содержащую акцепторный олигосахарид, получая уровни радиоактивности, эквивалентные фоновым.

Каждый квадрат бумаги сушили на воздухе, инкубировали со сцинтиллятором (2 мл) и дважды анализировали на радиоактивность в течение 5 мин. Ферментативные контроли включали добавление муравьиной кислоты перед добавлением фермента для получения условий, в которых он не может функционировать.

Анализ активности MXE отличался от анализа XET использованием 1% MLG в качестве донорного полисахарида вместо ХуГ.

Анализ CXE.

Тщательно смешивали 1 кБк высушенного [3 H]XXXGol и 33 мкл ферментативного экстракта (в 50 мМ MES; pH 6,0) и добавляли к 10 мг предварительно обработанной сухой бумаги Whatman 1CHR и инкубировали при комнатной температуре в течение до 24 ч. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% (мас./об.) муравьиной кислоты перед повторной промывкой в течение 8-16 ч для удаления непрореагировавшего [3 H]XXXGol. После последней промывки и удаления избытка воды целлюлозу собирали в 400 мкл воды с 4 мл смешиваемого с водой сцинтиллятора и переносили в сцинтилляционный флакон

перед анализом на радиоактивность.

Результаты.

Активности ХЕТ, МХЕ и СХЕ 10 мкл раствора рекомбинантно экспрессируемого белка после инкубации в течение 1 и 3 ч представлены в табл. 4.

Таблица 4

Активность ХЕТ (в качестве донора использовали ксилоглюкан (Тх) тамаринда), МХЕ (в качестве донора использовали MLG) и СХЕ (в качестве донора использовали целлюлозу) рекомбинантно экспрессируемого белка НТГ

Активность	Время инкубации	Акцептор	Фермент	Донор	Импульсы /мин (i)	Импульсы /мин (ii)	Импульсы/мин (av)
Контроль	1 ч.	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	12,60	11,00	11,80
ХЕТ	1 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Тх	1592,00	1594,60	1593,30
МХЕ	1 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	MLG	2143,01	2097,21	2120,11
Контроль	1 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Контроль	20,40	25,60	23,00
Контроль	3 ч.	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	12,60	11,00	11,80
ХЕТ	3 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Тх	2267,63	2256,43	2262,03
МХЕ	3 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	MLG	3141,65	3100,45	3121,05
Контроль	3 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Контроль	14,00	14,00	14,00
Контроль	1 ч.	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	3,51	2,91	3,21
СХЕ	1 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Целлюлоза	226,85	233,70	230,27
Контроль	3 ч.	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	Отрицательный контроль	3,51	2,91	3,21
СХЕ	3 ч.	[³ H]XXXGol	НТГ <i>Pichia</i>	Целлюлоза	549,28	559,70	554,49

Для определения исходных степеней активности МХЕ, ХЕТ и СХЕ белка НТГ, экспрессируемого в *Pichia*, осуществляли анализ МХЕ, ХЕТ и СХЕ в течение 16 ч и измеряли активность в несколько моментов времени.

Результаты по временной шкале представлены на фиг. 6. Исходные степени определяли по временной шкале, и они представлены в табл. 5.

Таблица 5

Исходные степени активностей ХЕТ, МХЕ и СХЕ белка НТГ, экспрессируемого в *Pichia*

ХЕТ	43 импульсов/мин/мин
МХЕ	112 импульсов/мин/мин
СХЕ	11,7 импульсов/мин/мин

В табл. 4 и 5 и на фиг. 6 показано, что рекомбинантно экспрессируемый белок НТГ *Equisetum* имеет активность МХЕ и ХЕТ, а также значительную активность СХЕ.

Активности СХЕ, МХЕ и ХЕТ белка НТГ, экспрессируемого в *Pichia*, также тестировали в присутствии BSA в реакционной смеси.

В кратком изложении, куски бумаги Whatman № 1 (каждый 2,0×1,15 см) предварительно обрабатывали 6 М NaOH (содержащем 1% мас./об. NaBH₄) при комнатной температуре в течение ночи, затем промывали проточной водопроводной водой, затем 1% уксусной кислотой и деионизированной водой и, в конце, сушили.

Смесь субстратов содержала (конечные концентрации):

[³H]XXXGol 50 кБк/мл (специфическая активность 900 МБк/мкмоль),

23 mM цитрат (Na⁺), pH 6,3,

32,4% (об./об.) использованной среды из экспрессирующей НТГ линии *Pichia*,

0 или 0,11% мас./об. BSA и

донорный субстрат-полисахарид, как подробно описано ниже.

Для анализа СХЕ 20 мкл (=1,00 кБк) смеси (без добавления полисахарида) наносили на высушенную бумагу (средняя масса сухого вещества бумаги=18,6 мг), сосуд плотно закрывали и осуществляли инкубацию при 20°C. В желаемые моменты времени реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до 20% об./об. Затем куски бумаги промывали проточной водопроводной водой, сушили и анализировали на включенную радиоактивность посредством сцинтилляционных измерений.

Для анализов МХЕ или ХЕТ 20 мкл (=1,00 кБк) реакционной смеси, дополненной 0,5% (мас./об.; конечная концентрация) β-глюкана ячменя со смешанными связями или ксилоглюкана тамаринда соответственно, инкубировали в виде свободного раствора при 20°C. Через интервалы реакцию останавливали добавлением NaOH до 0,1 М. Позднее смеси немного подкисляли уксусной кислотой и сушили на фильтровальной бумаге Whatman № 3; затем бумагу промывали в течение ночи в проточной водопроводной воде, сушили и анализировали на радиоактивность посредством сцинтилляционных измерений.

Графики зависимости от времени представлены на фиг. 9, и скорости реакций представлены в табл. 6 (вычисленные как импульсы/мин ^3H , включенного в полисахарид, на кБк восполненного акцепторного субстрата, на 1 ч инкубации).

BSA сильно стимулировал реакцию CXE, вероятно, противодействуя необратимому связыванию белка HTG с поверхностью бумаги; BSA имел относительно небольшой эффект в отношении скоростей MXE и XET.

Согласно данным +BSA, скорости находились в соотношении MXE:CXE:XET=100:38,4:38,2.

Согласно данным -BSA, скорости находились в соотношении MXE:CXE:XET=100:2,3:39, 1.

Таким образом, HTG является высокоактивным CXE-ферментом.

Таблица 6

Средние скорости реакций для трех ферментативных активностей HTG, экспрессируемого *Pichia*, в условиях, сделанных настолько прямо сопоставимыми, насколько это осуществимо

Параметр	CXE -BSA	CXE +BSA	MXE -BSA	MXE +BSA	XET -BSA	XET +BSA
Средняя скорость (импульсов/ мин/кБк/ч.)	0,88	17,20	38,65	44,85	15,11	17,14
Скорость (%) относительно MXE + BSA	1,96	38,36	86,17	100,00	33,69	38,21
Скорость (%) относительно MXE - BSA	2,27	44,51	100,00	116,05	39,10	44,35

Специфичность рекомбинантного HTG в отношении акцепторного субстрата.

Специфичность рекомбинантного HTG в отношении акцепторного субстрата тестировали в анализах (в отсутствие BSA) с использованием глюкана со смешанными связями из ячменя (BMLG) в качестве донора. Используемым ферментом являлся рекомбинантный фермент HTG, очищенный посредством аффинной хроматографии с использованием полигистидиновой метки. Все точки данных являются скорректированными средними значениями для трех независимых реакций.

Для акцепторных субстратов, демонстрирующих относительно низкую аффинность к бумаге, использовали общепринятый способ промывки бумаги (проточной водопроводной водой, в течение ночи). Для акцепторов, проявляющих высокую аффинность к бумаге (а именно целлогексита, манногексита, ксилогексита и олигосахаридов MLG), использовали стекловолоконный, в котором продукты реакции сушили на предварительно термически обработанной стекловолоконной бумаге Whatman GF/A, а затем промывали в 75% этаноле.

Результаты представлены на фиг. 7. Единственными акцепторными субстратами, которые рекомбинантный HTG был способен соединять до какой-либо значительной степени, являлись ксилоглюкановые олигосахариды. В следующем эксперименте специфичность в отношении акцепторного субстрата определяли для глюкана со смешанными связями и ксилоглюкана в качестве донора. Результаты представлены на фиг. 12. Наблюдали, что негликозилированные XGO являлись предпочтительными. Тот факт, что белок HTG использовал GXXGol также хорошо или лучше, чем XXXGol, отличает его от общепринятых XET, для которых необходимо ксилозилирование в положении заместителя +1; наоборот, в этом случае HTG, по-видимому, предпочтительно использует негликозилированные остатки Glc. Однако, несмотря на это предпочтение в отношении отсутствия ксилозилирования в положении +1, полная неспособность использовать GGXXXGol свидетельствует о том, что ксилозилирование в положении +2 является необходимым для активности белка HTG. Эта необходимость ксилозилирования в положении +2 соответствует неспособности белка использовать родственные нексилозилированные олигосахариды, такие как целлогексит и различные олигосахариды MLG.

Учитывая, что результаты, касающиеся специфичности в отношении донорного субстрата, свидетельствуют о том, что белок HTG предпочтительно использует MLG в качестве донорного субстрата относительно ксилоглюкана, эти результаты подтверждают, что он является преобладающей гетеротрансглюканазой. Хотя он способен катализировать активность XET (ксилоглюкан-ксилоглюкановую; фиг. 6), по-видимому, он полностью неспособен катализировать эндотрансгликозилирование MLG-MLG, как показано на фиг. 7 по его неспособности использовать олигосахариды MLG.

Вероятно, белок HTG имеет схожую специфичность в отношении акцепторного субстрата при использовании целлюлозы в качестве донора.

Это делает HTG первым растительным ферментом, преимущественной реакцией которого является гетеро-эндотрансгликозилирование, и первой эндотрансгликозилазой, предпочтительно использующей

MLG в качестве субстрата.

Специфичность в отношении акцепторного субстрата также тестировали для различных донорных субстратов, обработанной щелочью бумаги, глюкана со смешанными связями и ксилоглюкана. Наблюдали, что XXXGol являлся сильным акцептором при использовании обработанной щелочью бумаги и глюкана со смешанными связями в качестве донора, но трансгликозилирование при использовании GGGGol являлось гораздо менее эффективным (см. фиг. 11).

Субстратная специфичность рекомбинантного HTG в отношении различных целлюлозных субстратов.

Катализируемое HTG трансгликозилирование с использованием [^3H]XXXGol в качестве акцепторного субстрата и различных донорных субстратов тестировали в присутствии и отсутствие BSA и с использованием глюкана со смешанными связями в качестве контроля (см. фиг. 10). Наблюдали, что в оптимизированных условиях HTG имел соотношение активности ХЕТ:МХЕ $\sim 1:7$. Также наблюдали, что водорастворимый ацетат целлюлозы являлся лишь слабым донором, но HTG имел исключительную активность СХЕ в отношении (нерастворимой) целлюлозы. Более 94% радиоактивного продукта СХЕ не подвергалось солюбилизации в 6 М NaOH при 37°C (данные не представлены), что свидетельствует об устойчивой целостности волокон. BSA сильно стимулирует реакцию СХЕ на обработанной щелочью бумаге и на немелованной бумаге.

Аффинность рекомбинантного HTG к XXXGol.

Аффинность рекомбинантного HTG к XXXGol определяли по скорости реакции (фмоль/ч) с глюканом со смешанными связями и ксилоглюканом в качестве донора при разных концентрациях XXXGol. Обнаруживали, что K_M для XXXGol с глюканом со смешанными связями в качестве донорного субстрата составляла $0,52 \pm 0,06$ мкМ, и K_M для XXXGol с ксилоглюканом в качестве донорного субстрата составляла $3,4 \pm 0,4$ мкМ. Это свидетельствует о том, что HTG имеет гораздо более высокую аффинность к XXXGol, чем ХТН ($K_M \sim 50-200$ мкМ).

Аффинность рекомбинантного HTG к растворимым донорным полисахаридам определяли посредством измерения степени включения ^3H при разных концентрациях полисахаридов. Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7

Значения $V_{\max}$ и K_M рекомбинантного HTG для различных растворимых донорных полисахаридов

Донорный полисахарид	$V_{\max}$ (Бк/кБк/ч.)	K_M (мг/мл)
Ксилоглюкан	$0,626 \pm 0,057$	$0,226 \pm 0,077$
Глюкан со смешанными связями из ячменя	$7,59 \pm 0,60$	$1,25 \pm 0,32$
Водорастворимый ацетат целлюлозы	$0,29 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,60$
Глюкан со смешанными связями из исландского мха	$0,098 \pm 0,014$	$3,05 \pm 1,15$

В табл. 7 показано, что HTG имеет более низкую аффинность к MLG ячменя, чем к ксилоглюкану. MLG из исландского мха, в основном содержащий повторяющиеся целлотриозидовые звенья, являлся плохим донорным субстратом. Таким образом, HTG, вероятно, распознает повторяющиеся целлотриозидовые звенья, встречающиеся в MLG ячменя и преобладающие в MLG *Equisetum*.

Пример 5. Трансформация растений с использованием HTG.

Конструировали вектор Т-ДНК, кодирующий слитый белок из 27 аминокислот сигнальной последовательности гена альфа-амилазы 3 риса (Sutcliffe et al., 1991, Plant Mol Biol 16:579) и аминокислот 22-280 SEQ ID NO: 2 под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты.

Растения пшеницы трансформировали с использованием вектора Т-ДНК, кодирующего слитый белок HTG. Наблюдали, что трансформированные растения пшеницы имели повышенную прочность стеблей, приводящую к улучшенной устойчивости к полеганию стеблей, и повышенную устойчивость к патогенам.

Ссылки.

Abdel-Massih RM, Baydoun EA, Brett CT (2003). In vitro biosynthesis of 1,4-beta-galactan attached to a pectin-xyloglucan complex in pea. Planta 216(3), 275-286.

Ait-Mohand F, Farkaš V (2006) Screening for hetero-

transglycosylating activities in extracts from nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Carbohydrate Research* 341: 577-581.

An YQ, Huang S, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB (1996). Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT 3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *Plant Cell* 8: 15-30.

Bacic, A., Harris, P. J., and Stone, B. A. (1988) in *The Biochemistry of Plants* (Priess J., ed) pp. 297-371, Academic Press, New York.

Barry, G., Kishore, G., Padgett, S. et al. Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. *Curr Topics Plant Physiol* 7:139-145 (1992).

Baumann MJ, Eklöf JM, Michel G, Kallas AM, Teeri TT, Czjzek M, Brumer H 3rd. (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. *Plant Cell*. 2007 Jun;19(6):1947-63.

Benfey PN, Ren L, Chua NH. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J*. 8:2195-2202.

Chabouté et al., 1987. Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants. *Gene, Volume 71, Issue 1*, 15, pp 217-223.

Cocuron, J.C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A.P., Liepman, A.H., Keegstra, K., Raikhel, N. and Wilkerson, C.G. (2007) A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a b-1,4 glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 8550-8555.

Comai L, Sen LC, Stalker DM. (1983). An Altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *Science* 221, 370-371.

Cornelissen BJ, Hooft van Huijsduijnen RA, Van Loon LC, Bol JF. (1986). Molecular characterization of messenger RNAs for 'pathogenesis related' proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV

infection of tobacco. EMBO J 5:37-40.

Cornelissen M. and Vandewiele M. (1989). Nucleic Acids Research, 17, 19-25.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y) 11(8):905-10.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 807-813.

Cumming CM, Rizkallah HD, McKendrick KA, Abdel-Massih RM, Baydoun EA, Brett CT. (2005). Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta* 222, 546-555.

Datla R, Anderson J W, Selvaraj G (1997). Plant promoters for transgene expression. Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296.

Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K. (2002). An Arabidopsis gene encoding an alpha-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. PNAS 99(11): 7797-7802.

Franková L and Fry SC (2013) Darwin Review: Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. J Exp Bot 64: 3519-3550.

Fry SC, Smith RC, Renwick KF, Martin DJ, Hodge SK, Matthews KJ (1992) Xyloglucan Endotransglycosylase, A New Wall-Loosening Enzyme-Activity from Plants. Biochemical Journal 282: 821-828.

Fry SC, Mohler KE, Nesselrode BHWA, Frankova L (2008 a) Mixed-linkage beta-glucan : xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from *Equisetum* (horsetails) and charophytic algae. Plant Journal 55: 240-252.

Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau J-P, Kato Y, Perez Lorences E, MacLachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Reid JSG, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White AR (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Physiologia Plantarum 89: 1-3.

Gasser, C.S., J.A. Winter, C.M. Hironaka, D.M. Shah (1988). Structure, expression, and evolution of the 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J. Biol. Chem.* 263: 4280-4289.

Gritch et al (2006). *PNAS* 103(40), 14701-14706.

Gurjanov OP, Ibragimova NN, Gnezdilov OI, Gorshkova TA (2008) Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification. *Carbohydrate Polymers* 72: 719-729.

Harpster et al., 1988, *Mol Gen Genet.* 212(1):182-90.

Holtorf S, Apel K, Bohlmann H. (1995). Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29:637-649.

Hou et al., 2008, *Chinese Science Bulletin* 53, pp 2639-2645.

Hrmova, M., Farkaš, V., Lahnstein, J., Fincher, G. B. (2007). A Barley Xyloglucan Xyloglucosyl Transferase Covalently Links Xyloglucan, Cellulosic Substrates, and (1,3;1,4)- β -D-Glucans. *JBC* 282 (17); pp. 12951-62.

Keller B, Sauer N, Lamb CJ (1988). Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7(12): 3625-3633.

Keller B, Lamb CJ. (1989). Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev.* 3: 1639-1646.

Lindbo (2007). *Plant Physiology* 145, 1232-1240.

Logan, Edwards and Saunders (Editors; Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Caister Academic Press 2009, ISBN: 978-1-904455-39-4.

Maris A, Kaewthai N, Eklof JM, Miller JG, Brumer H, Fry SC, Verbelen JP, Vissenberg K (2011) Differences in enzymic properties of five recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62: 261-271.

Moellenbeck DJ, Peters ML, Bing JW, Rouse JR, Higgins LS, Sims L, Nevshemal T, Marshall L, Ellis RT, Bystrak PG, Lang BA, Stewart JL, Kouba K, Sondag V, Gustafson V, Nour K, Xu D,

Swenson J, Zhang J, Czapla T, Schwab G, Jayne S, Stockhoff BA, Narva K, Schnepf HE, Stelman SJ, Poutre C, Koziel M, Duck N. (2001). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nat. Biotechnol.* 19: 668-72.

Moreira A (2004) Genetic Algorithms for the imitation of genomic styles in protein backtranslation. *Theor Comput Sci* 332: 297-312.

Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 165-178.

Needleman and Wunsch (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 48, p.443-453.

Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 6;313(6005):810-2.

Pearson and Lipman (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci* 85, p.2444-48.

Peleman J, Saito K, Cottyn B, Engler G, Seurinck J, Van Montagu M, Inzé D (1989). Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 84: 359-369.

Pu L, Li Q, Fan X, Yang W, Xue Y (2008). The R2R3 MYB transcription factor GhMYB109 is required for cotton fiber development. *Genetics* 180, pp 811-820.

Rose JKC, Bennett AB (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* 4: 176-183.

Sambrook, J.F., Russell, D.W. and Irwin, N. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition Volumes 1, 2, and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samac DA, Tesfaye M, Dornbusch M, Saruul P, Temple SJ (2004). A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res.* 13(4):349-61).

Sanger M, Daubert S, Goodman RM (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol Biol.* 14(3):433-43).

Schnepf HE, Lee S, Dojillo J, Burmeister P, Fencil K, Morera L, Nygaard L, Narva KE, Wolt JD. (2006). Characterization of Cry34/Cry35 Binary Insecticidal Proteins from Diverse *Bacillus thuringiensis* Strain Collections. *Applied Environm. Microbiol.* 71, 1765-1774.

Schramm, G, Bruchhaus, I and Roeder, T (2000). A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Research* 28: e96.

Shah, DM, Horsch, RB, Klee, HJ, Kishore, GM, Winter, JA, Tumer, NE, Hironaka, CM, Sanders, PR, Gasser, CS, Aykent, S, Siegel, NR, Rogers, SG and Fraley, RT (1986). Engineering Herbicide Tolerance in Transgenic Plants. *Science* 233, 478-481.

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science* 306: 2206-2211.

Sørensen I, Pettolino FA, Wilson SM, Doblin MS, Johansen B, Bacic A, Willats WGT (2008) Mixed-linkage (1 → 3), (1 → 4)-beta-D-glucan is not unique to the poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. *Plant Journal* 54: 510-521.

Thompson, JE and Fry, SC (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, 275-286.

Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci* 50:700-712.

Wagner et al (2004). *Methods* 32, 227-234.

Waterman, M. S. (1995). *Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and genomes*. Chapman & Hall. London.

Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, Rocchetti M, Mingozzi F, Foti M, Chirico G, Costa B, Zaza A, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F. (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460, p:264-268, see also *Nature Protocols: mRNA expression analysis by Real-Time PCR*; ISSN: 1754-2189.

Список последовательностей

<110> Bayer CropScience NV
The University Court of the University of Edinburgh
Meulewaeter, Frank
Brande, Ilse Van den
Fry, Stephen C
Mohler, Kyle E
Frankova, Lenka
Simmons, Tom J
Holland, Claire
Hudson, Andrew

<120> БЕЛОК С АКТИВНОСТЬЮ ЦЕЛЛЮЛОЗА:КСИЛОГЛЮКАН-
ЭНДОТРАНСГЛЮКОЗИЛАЗЫ (СХЕ) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

<130> BCS13-2019

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 843
<212> ДНК
<213> Equisetum fluviatile

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(843)

<220>
<221> с и г н а л ь н ы й п е п т и д
<222> (1)..(63)

<400> 1
atg ctg ggt ctg gtg ttt gga atg ttg gtg atc atg ctg gcg tct cca 48
Met Leu Gly Leu Val Phe Gly Met Leu Val Ile Met Leu Ala Ser Pro
1 5 10 15
aaa tta gca atg gca ggt ttc tat ggg gac ttt cag gta gaa ccg gtt 96
Lys Leu Ala Met Ala Gly Phe Tyr Gly Asp Phe Gln Val Glu Pro Val
20 25 30
ccc gac cac gtg ata atc caa agc gat agc ctc ctc caa ctc acc atg 144
Pro Asp His Val Ile Ile Gln Ser Asp Ser Leu Leu Gln Leu Thr Met
35 40 45
gat aag aac tct ggt ggc tca gtt gtc tcc aaa agt aat tat ctg ttt 192
Asp Lys Asn Ser Gly Gly Ser Val Val Ser Lys Ser Asn Tyr Leu Phe
50 55 60

036403

ggc tac ttc aac atg aag atg aag ctc ata tca gga aac tct gca ggg	240
Gly Tyr Phe Asn Met Lys Met Lys Leu Ile Ser Gly Asn Ser Ala Gly	
65 70 75 80	
aca gta acc aca ttc tat atc ttc tct gat gaa gca aac cac gat gag	288
Thr Val Thr Thr Phe Tyr Ile Phe Ser Asp Glu Ala Asn His Asp Glu	
85 90 95	
ata gac ttt gag ttc ctt ggc aac tat tca ggg gat cct tat ctt ttg	336
Ile Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Tyr Ser Gly Asp Pro Tyr Leu Leu	
100 105 110	
cat act aat att ttt gca agt ggt gtt gga aat aga gaa caa caa ttt	384
His Thr Asn Ile Phe Ala Ser Gly Val Gly Asn Arg Glu Gln Gln Phe	
115 120 125	
ttt ctg tgg ttt gac cct aca gct gac ttc cat gat tat aca ata att	432
Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Ala Asp Phe His Asp Tyr Thr Ile Ile	
130 135 140	
tgg aac cct caa caa ata ttg ttt ctt gtt gat gga agg gct gtt aga	480
Trp Asn Pro Gln Gln Ile Leu Phe Leu Val Asp Gly Arg Ala Val Arg	
145 150 155 160	
tct ttt ccg aat aat gag gct ata ggt gtc cct tac tta aaa agt caa	528
Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val Pro Tyr Leu Lys Ser Gln	
165 170 175	
tgg atg aat gta cat tta agt ctt tgg aat ggc gag act tgg gcc aca	576
Trp Met Asn Val His Leu Ser Leu Trp Asn Gly Glu Thr Trp Ala Thr	
180 185 190	
cta gga ggg ttg aga agg ata gat tgg aat tca gcc cct ttt gta gct	624
Leu Gly Gly Leu Arg Arg Ile Asp Trp Asn Ser Ala Pro Phe Val Ala	
195 200 205	
tcc tat tct act ttt gta gga gac tca tgc ttc gat agc gca gat tcc	672
Ser Tyr Ser Thr Phe Val Gly Asp Ser Cys Phe Asp Ser Ala Asp Ser	
210 215 220	
ccg tgc atg gcc tca aaa tgg tgg aac caa gct gca tat caa tct tta	720
Pro Cys Met Ala Ser Lys Trp Trp Asn Gln Ala Ala Tyr Gln Ser Leu	
225 230 235 240	

Arg Glu Cys Ser Asn Arg Gly Phe
275 280

<210> 2

<211> 280

<212> Б е л о к

<213> Equisetum fluviatile

<400> 2

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

Lys Leu Ala Met Ala Gly Phe Tyr Gly Asp Phe Gln Val Glu Pro Val
20 25 30

Pro Asp His Val Ile Ile Gln Ser Asp Ser Leu Leu Gln Leu Thr Met
35 40 45

Asp Lys Asn Ser Gly Gly Ser Val Val Ser Lys Ser Asn Tyr Leu Phe
50 55 60

Gly Tyr Phe Asn Met Lys Met Lys Leu Ile Ser Gly Asn Ser Ala Gly
65 70 75 80

Thr Val Thr Thr Phe Tyr Ile Phe Ser Asp Glu Ala Asn His Asp Glu
85 90 95

Ile Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Tyr Ser Gly Asp Pro Tyr Leu Leu
100 105 110

His Thr Asn Ile Phe Ala Ser Gly Val Gly Asn Arg Glu Gln Gln Phe
115 120 125

Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Ala Asp Phe His Asp Tyr Thr Ile Ile
130 135 140

Trp Asn Pro Gln Gln Ile Leu Phe Leu Val Asp Gly Arg Ala Val Arg
145 150 155 160

Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val Pro Tyr Leu Lys Ser Gln
165 170 175

036403

Trp Met Asn Val His Leu Ser Leu Trp Asn Gly Glu Thr Trp Ala Thr
180 185 190

Leu Gly Gly Leu Arg Arg Ile Asp Trp Asn Ser Ala Pro Phe Val Ala
195 200 205

Ser Tyr Ser Thr Phe Val Gly Asp Ser Cys Phe Asp Ser Ala Asp Ser
210 215 220

Pro Cys Met Ala Ser Lys Trp Trp Asn Gln Ala Ala Tyr Gln Ser Leu
225 230 235 240

Ser Thr Ser Asp Ala Ser Ser Ile Gln Trp Val Arg Glu Asn Tyr Leu
245 250 255

Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Lys Leu Tyr Pro Asn Gly Phe Pro
260 265 270

Arg Glu Cys Ser Asn Arg Gly Phe
275 280

<210> 3
<211> 1122
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> кодирующая последовательность слитого
белка СХЕ для экспрессии в Pichia

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1122)

<220>
<221> сигнальная последовательность альфа-
фактора
<222> (1)..(267)

<220>
<221> HTG
<222> (274)..(1050)

<220>

<221> э п и т о п с-мус

<222> (1057).. (1086)

<220>

<221> п о л и г и с т и д и н о в а я м е т к а

<222> (1102).. (1119)

<400> 3

atg	aga	ttt	cct	tca	att	ttt	act	gct	gtt	tta	ttc	gca	gca	tcc	tcc	48
Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	
1				5					10					15		

gca	tta	gct	gct	cca	gtc	aac	act	aca	aca	gaa	gat	gaa	acg	gca	caa	96
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln	
				20					25					30		

att	ccg	gct	gaa	gct	gtc	atc	ggc	tac	tca	gat	tta	gaa	ggg	gat	ttc	144
Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	
		35				40						45				

gat	gtt	gct	gtt	ttg	cca	ttt	tcc	aac	agc	aca	aat	aac	ggg	tta	ttg	192
Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	
	50					55						60				

ttt	ata	aat	act	act	att	gcc	agc	att	gct	gct	aaa	gaa	gaa	ggg	gta	240
Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	
65					70				75					80		

tct	ctc	gag	aaa	aga	gag	gct	gaa	gct	gaa	ttc	ggc	ttc	tat	ggg	gac	288
Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asp	
				85					90					95		

ttt	cag	gta	gaa	ccg	gtt	ccc	gac	cac	gtg	ata	atc	caa	agc	gat	agc	336
Phe	Gln	Val	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	His	Val	Ile	Ile	Gln	Ser	Asp	Ser	
				100					105					110		

ctc	ctc	caa	ctc	acc	atg	gat	aag	aac	tct	ggc	ggc	tca	gtt	gtc	tcc	384
Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Met	Asp	Lys	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Val	Ser	
		115							120				125			

aaa	agt	aat	tat	ctg	ttt	ggc	tac	ttc	aac	atg	aag	atg	aag	ctc	ata	432
Lys	Ser	Asn	Tyr	Leu	Phe	Gly	Tyr	Phe	Asn	Met	Lys	Met	Lys	Leu	Ile	
		130				135					140					

tca	gga	aac	tct	gca	ggg	aca	gta	acc	aca	ttc	tat	atc	ttc	tct	gat	480
Ser	Gly	Asn	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Phe	Tyr	Ile	Phe	Ser	Asp	
145					150					155				160		

gaa	gca	aac	cac	gat	gag	ata	gac	ttt	gag	ttc	ctt	ggc	aac	tat	tca	528
Glu	Ala	Asn	His	Asp	Glu	Ile	Asp	Phe	Glu	Phe	Leu	Gly	Asn	Tyr	Ser	
				165					170					175		

036403

ggg gat cct tat ctt ttg cat act aat att ttt gca agt ggt gtt gga Gly Asp Pro Tyr Leu Leu His Thr Asn Ile Phe Ala Ser Gly Val Gly 180 185 190	576
aat aga gaa caa caa ttt ttt ctg tgg ttt gac cct aca gct gac ttc Asn Arg Glu Gln Gln Phe Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Ala Asp Phe 195 200 205	624
cat gat tat aca ata att tgg aac cct caa caa ata ttg ttt ctt gtt His Asp Tyr Thr Ile Ile Trp Asn Pro Gln Gln Ile Leu Phe Leu Val 210 215 220	672
gat gga agg gct gtt aga tct ttt ccg aat aat gag gct ata ggt gtc Asp Gly Arg Ala Val Arg Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val 225 230 235 240	720
cct tac tta aaa agt caa tgg atg aat gta cat tta agt ctt tgg aat Pro Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Met Asn Val His Leu Ser Leu Trp Asn 245 250 255	768
ggc gag act tgg gcc aca cta gga ggg ttg aga agg ata gat tgg aat Gly Glu Thr Trp Ala Thr Leu Gly Gly Leu Arg Arg Ile Asp Trp Asn 260 265 270	816
tca gcc cct ttt gta gct tcc tat tct act ttt gta gga gac tca tgc Ser Ala Pro Phe Val Ala Ser Tyr Ser Thr Phe Val Gly Asp Ser Cys 275 280 285	864
ttc gat agc gca gat tcc ccg tgc atg gcc tca aaa tgg tgg aac caa Phe Asp Ser Ala Asp Ser Pro Cys Met Ala Ser Lys Trp Trp Asn Gln 290 295 300	912
gct gca tat caa tct tta agc aca agt gat gcc agc agt att caa tgg Ala Ala Tyr Gln Ser Leu Ser Thr Ser Asp Ala Ser Ser Ile Gln Trp 305 310 315 320	960
gtt agg gaa aat tat ctc aaa tat gac tat tgt tat gat aca aaa ctc Val Arg Glu Asn Tyr Leu Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Lys Leu 325 330 335	1008
tat ccg aac ggc ttt ccc aga gaa tgc tca aac cgt ggt ttc tat cta Tyr Pro Asn Gly Phe Pro Arg Glu Cys Ser Asn Arg Gly Phe Tyr Leu 340 345 350	1056
gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His 355 360 365	1104
cat cat cat cat cat tga His His His His His 370	1122

036403

<210> 4

<211> 373

<212> Б е л о к

<213> и с к у с с т в е н н а я

<220>

<223> с и н т е т и ч е с к а я к о н с т р у к ц и я

<400> 4

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

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

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gly Phe Tyr Gly Asp
85 90 95

Phe Gln Val Glu Pro Val Pro Asp His Val Ile Ile Gln Ser Asp Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Leu Thr Met Asp Lys Asn Ser Gly Gly Ser Val Val Ser
115 120 125

Lys Ser Asn Tyr Leu Phe Gly Tyr Phe Asn Met Lys Met Lys Leu Ile
130 135 140

Ser Gly Asn Ser Ala Gly Thr Val Thr Thr Phe Tyr Ile Phe Ser Asp
145 150 155 160

Glu Ala Asn His Asp Glu Ile Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Tyr Ser
165 170 175

036403

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

Asn Arg Glu Gln Gln Phe Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Ala Asp Phe
195 200 205

His Asp Tyr Thr Ile Ile Trp Asn Pro Gln Gln Ile Leu Phe Leu Val
210 215 220

Asp Gly Arg Ala Val Arg Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val
225 230 235 240

Pro Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Met Asn Val His Leu Ser Leu Trp Asn
245 250 255

Gly Glu Thr Trp Ala Thr Leu Gly Gly Leu Arg Arg Ile Asp Trp Asn
260 265 270

Ser Ala Pro Phe Val Ala Ser Tyr Ser Thr Phe Val Gly Asp Ser Cys
275 280 285

Phe Asp Ser Ala Asp Ser Pro Cys Met Ala Ser Lys Trp Trp Asn Gln
290 295 300

Ala Ala Tyr Gln Ser Leu Ser Thr Ser Asp Ala Ser Ser Ile Gln Trp
305 310 315 320

Val Arg Glu Asn Tyr Leu Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Lys Leu
325 330 335

Tyr Pro Asn Gly Phe Pro Arg Glu Cys Ser Asn Arg Gly Phe Tyr Leu
340 345 350

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His
355 360 365

His His His His His
370

<210> 5
 <211> 852
 <212> ДНК
 <213> Equisetum hyemale

<220>
 <221> с и г н а л ь н ы й п е п т и д
 <222> (1).. (75)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (852)

<400> 5
 atg aag aag aag att gga atg gtg ctg ctt ttg ggg ctt ttc atg atc 48
 Met Lys Lys Lys Ile Gly Met Val Leu Leu Leu Gly Leu Phe Met Ile
 1 5 10 15

atc ata gcg tct ccc aaa gca gag gca aat ttc tat caa gat ttc gtc 96
 Ile Ile Ala Ser Pro Lys Ala Glu Ala Asn Phe Tyr Gln Asp Phe Val
 20 25 30

gta gtt aca gct cct gac cat gtc caa atc ctt aat gat aac ctc ctc 144
 Val Val Thr Ala Pro Asp His Val Gln Ile Leu Asn Asp Asn Leu Leu
 35 40 45

cag ctt acc atg gat aag aat act ggt agc tca att agc tcc acc agt 192
 Gln Leu Thr Met Asp Lys Asn Thr Gly Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser
 50 55 60

aaa tac ctg ttt ggc tac ttc aac atg agg atg aag ctc ata gca ggc 240
 Lys Tyr Leu Phe Gly Tyr Phe Asn Met Arg Met Lys Leu Ile Ala Gly
 65 70 75 80

aac tct gca ggg aca gtg acc acc ttc tat ctc ttc tcc agt gaa ccc 288
 Asn Ser Ala Gly Thr Val Thr Thr Phe Tyr Leu Phe Ser Ser Glu Pro
 85 90 95

aac cat gat gag cta gac ttt gag ttc ctt ggc aat ctt tca ggg gaa 336
 Asn His Asp Glu Leu Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Leu Ser Gly Glu
 100 105 110

cct tat gtt ttg cat aca aat gtt ttt gca agt ggt gtt gga aat aga 384
 Pro Tyr Val Leu His Thr Asn Val Phe Ala Ser Gly Val Gly Asn Arg
 115 120 125

gaa caa caa ttt ttt ctg tgg ttt gac cct aca act gac ttc cac gac 432
 Glu Gln Gln Phe Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Thr Asp Phe His Asp
 130 135 140

tat aca ata att tgg aac cct caa caa gta ttg ttt gtt gtt gat gga 480
 Tyr Thr Ile Ile Trp Asn Pro Gln Gln Val Leu Phe Val Val Asp Gly

036403

145	150	155	160	
agg act gtt aga tct ttc cca aat aat gag gct ata ggt gtc cct tac				528
Arg Thr Val Arg Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val Pro Tyr				
165	170	175		
tta aaa agt caa tgg atg aat gta tat gca agc ctt tgg aat ggt gag				576
Leu Lys Ser Gln Trp Met Asn Val Tyr Ala Ser Leu Trp Asn Gly Glu				
180	185	190		
tct tgg gcc aca cta gga ggg ctg ata aag ata gat tgg agt gta tcc				624
Ser Trp Ala Thr Leu Gly Gly Leu Ile Lys Ile Asp Trp Ser Val Ser				
195	200	205		
cct ttt gtg gct tcc tat gct gat ttt gca gca gac tca tgc ttt gat				672
Pro Phe Val Ala Ser Tyr Ala Asp Phe Ala Ala Asp Ser Cys Phe Asp				
210	215	220		
agt gca gat tcc tca tgc atg gcc aca aag tgg tgg aac caa cct gca				720
Ser Ala Asp Ser Ser Cys Met Ala Thr Lys Trp Trp Asn Gln Pro Ala				
225	230	235	240	
tat caa ttt tta agc aca aat gat gca agc agt att caa tgg gtt agg				768
Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Asn Asp Ala Ser Ser Ile Gln Trp Val Arg				
245	250	255		
gca aat tat ctc aaa tac gac tat tgt tat gat acg gaa ctc tat cca				816
Ala Asn Tyr Leu Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Glu Leu Tyr Pro				
260	265	270		
act cct ccc atc gaa tgt cag aac cgt ggc ttc tag				852
Thr Pro Pro Ile Glu Cys Gln Asn Arg Gly Phe				
275	280			

<210> 6
 <211> 283
 <212> Б е л о к
 <213> Equisetum hyemale

<400> 6

Met Lys Lys Lys Ile Gly Met Val Leu Leu Leu Gly Leu Phe Met Ile
1 5 10 15

Ile Ile Ala Ser Pro Lys Ala Glu Ala Asn Phe Tyr Gln Asp Phe Val
20 25 30

036403

Gln Leu Thr Met Asp Lys Asn Thr Gly Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser
50 55 60

Lys Tyr Leu Phe Gly Tyr Phe Asn Met Arg Met Lys Leu Ile Ala Gly
65 70 75 80

Asn Ser Ala Gly Thr Val Thr Thr Phe Tyr Leu Phe Ser Ser Glu Pro
85 90 95

Asn His Asp Glu Leu Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Leu Ser Gly Glu
100 105 110

Pro Tyr Val Leu His Thr Asn Val Phe Ala Ser Gly Val Gly Asn Arg
115 120 125

Glu Gln Gln Phe Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Thr Asp Phe His Asp
130 135 140

Tyr Thr Ile Ile Trp Asn Pro Gln Gln Val Leu Phe Val Val Asp Gly
145 150 155 160

Arg Thr Val Arg Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly Val Pro Tyr
165 170 175

Leu Lys Ser Gln Trp Met Asn Val Tyr Ala Ser Leu Trp Asn Gly Glu
180 185 190

Ser Trp Ala Thr Leu Gly Gly Leu Ile Lys Ile Asp Trp Ser Val Ser
195 200 205

Pro Phe Val Ala Ser Tyr Ala Asp Phe Ala Ala Asp Ser Cys Phe Asp
210 215 220

Ser Ala Asp Ser Ser Cys Met Ala Thr Lys Trp Trp Asn Gln Pro Ala
225 230 235 240

Tyr Gln Phe Leu Ser Thr Asn Asp Ala Ser Ser Ile Gln Trp Val Arg
245 250 255

036403

Ala Asn Tyr Leu Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Glu Leu Tyr Pro
 260 265 270

Thr Pro Pro Ile Glu Cys Gln Asn Arg Gly Phe
 275 280

<210> 7
 <211> 864
 <212> ДНК
 <213> Equisetum diffusum

<220>
 <221> с и г н а л ь н ы й п е п т и д
 <222> (1).. (84)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (864)

<400> 7
 atg aag aag aag acc gcg tcg atg ctg ggt ttg gcg ttt ggg atg ttg 48
 Met Lys Lys Lys Thr Ala Ser Met Leu Gly Leu Ala Phe Gly Met Leu
 1 5 10 15
 ttg atc atg ctg gcg tct cca aaa tta gca ata gca ggt ttc tat gag 96
 Leu Ile Met Leu Ala Ser Pro Lys Leu Ala Ile Ala Gly Phe Tyr Glu
 20 25 30
 gac ttt gac gta gat cca cct ccc gac cac gtg ata atc caa agt gat 144
 Asp Phe Asp Val Asp Pro Pro Asp His Val Ile Ile Gln Ser Asp
 35 40 45
 agc ctc ctc gaa ctc acc atg gat aag aac tct ggt agc aca gtt gtc 192
 Ser Leu Leu Glu Leu Thr Met Asp Lys Asn Ser Gly Ser Thr Val Val
 50 55 60
 tcc acc cgt aaa tat ctg ttt ggc tac ttc aac atg aag atg aag ctc 240
 Ser Thr Arg Lys Tyr Leu Phe Gly Tyr Phe Asn Met Lys Met Lys Leu
 65 70 75 80
 ata tca ggc aac tct gca ggg aca gta acc aca ttc tat atc ttc tct 288
 Ile Ser Gly Asn Ser Ala Gly Thr Val Thr Thr Phe Tyr Ile Phe Ser
 85 90 95
 gag gaa gca aac cac gat gag ata gac ttt gag ttc ctt ggc aac tat 336
 Glu Glu Ala Asn His Asp Glu Ile Asp Phe Glu Phe Leu Gly Asn Tyr
 100 105 110
 tca ggg gat cct tat ctt ttg cat act aat att ttt gca agt ggt gtt 384
 Ser Gly Asp Pro Tyr Leu Leu His Thr Asn Ile Phe Ala Ser Gly Val

036403

115	120	125	
gga aat aga gaa caa caa ttt ttt ctg tgg ttt gac cct aca gct gac			432
Gly Asn Arg Glu Gln Gln Phe Phe Leu Trp Phe Asp Pro Thr Ala Asp			
130	135	140	
ttc cat gat tat aca ata att tgg aac cct caa caa ata ttg ttt ctt			480
Phe His Asp Tyr Thr Ile Ile Trp Asn Pro Gln Gln Ile Leu Phe Leu			
145	150	155	160
ggt gat gga agg gct gtt aga tct ttt ccg aat aat gag gct ata ggt			528
Val Asp Gly Arg Ala Val Arg Ser Phe Pro Asn Asn Glu Ala Ile Gly			
165	170	175	
gtc cct tac tta aaa agt caa tgg atg aat gta cat tta agt ctt tgg			576
Val Pro Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Met Asn Val His Leu Ser Leu Trp			
180	185	190	
aat ggc gag act tgg gcc aca cta gga ggg ttg aga agg ata gat tgg			624
Asn Gly Glu Thr Trp Ala Thr Leu Gly Gly Leu Arg Arg Ile Asp Trp			
195	200	205	
aat tca gcc cct ttt gta gct tcc tat tct act ttt gta gga gac tca			672
Asn Ser Ala Pro Phe Val Ala Ser Tyr Ser Thr Phe Val Gly Asp Ser			
210	215	220	
tgc ttc gat agc gca gat tcc ccg tgc atg gcc tca aaa tgg tgg aac			720
Cys Phe Asp Ser Ala Asp Ser Pro Cys Met Ala Ser Lys Trp Trp Asn			
225	230	235	240
caa gct gca tat caa tct tta agc aca agt gat gcc agc agt att caa			768
Gln Ala Ala Tyr Gln Ser Leu Ser Thr Ser Asp Ala Ser Ser Ile Gln			
245	250	255	
tgg gtt agg gca aat tat ctc aaa tat gac tat tgt tat gat aca aaa			816
Trp Val Arg Ala Asn Tyr Leu Lys Tyr Asp Tyr Cys Tyr Asp Thr Lys			
260	265	270	
ctc tat ccg aac ggc ttt ccc agc gaa tgc tca aac cgt ggt ttc tag			864
Leu Tyr Pro Asn Gly Phe Pro Ser Glu Cys Ser Asn Arg Gly Phe			
275	280	285	

<210> 8
 <211> 287
 <212> Б е л о к
 <213> Equisetum diffusum

<400> 8

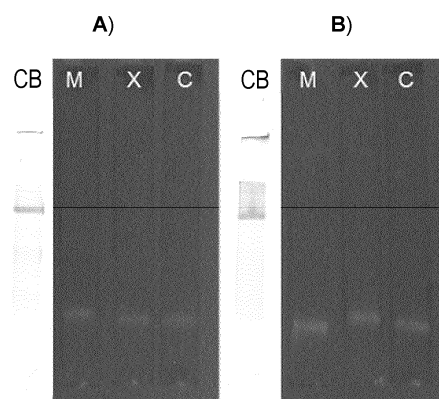
Met Lys Lys Lys Thr Ala Ser Met Leu Gly Leu Ala Phe Gly Met Leu
 1 5 10 15

036403

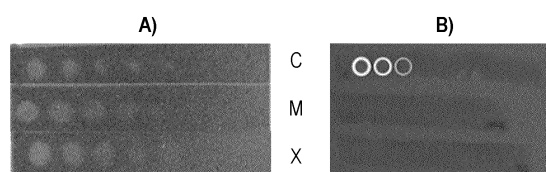
Leu Ile Met Leu Ala Ser Pro Lys Leu Ala Ile Ala Gly Phe Tyr Glu
 20 25 30
 Asp Phe Asp Val Asp Pro Pro Pro Asp His Val Ile Ile Gln Ser Asp
 35 40 45
 Ser Leu Leu Glu Leu Thr Met Asp Lys Asn Ser Gly Ser Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Thr Arg Lys Tyr Leu Phe Gly Tyr Phe Asn Met Lys Met Lys Leu
 65 70 75 80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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

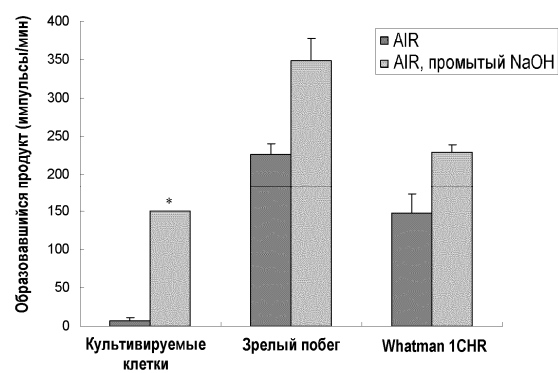
1. Белок, имеющий активность целлюлоза:ксилоглюкан-эндотрансглюкозилазы, содержащий:
 - (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 6 или 8; или
 - (b) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности SEQ ID NO: 2, 6 или 8; или
 - (c) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности аминокислот 22-280 SEQ ID NO: 2, или последовательности аминокислот 26-283 SEQ ID NO: 6, или последовательности аминокислот 29-287 SEQ ID NO: 8.
2. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая белок по п.1.
3. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, выбранная из:
 - (a) нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность SEQ ID NO: 1, 5 или 7 или комплементарную любой из них последовательность;
 - (b) нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеотидов 64-840 SEQ ID NO: 1 или комплементарную ей последовательность, или последовательность нуклеотидов 76-849 SEQ ID NO: 5 или комплементарную ей последовательность, или последовательность нуклеотидов 85-861 SEQ ID NO: 7 или комплементарную ей последовательность.
4. Химерный ген, содержащий следующие функционально связанные элементы:
 - (a) промотор, экспрессирующийся в растениях;
 - (b) нуклеиновую кислоту по п.2 и
 - (c) область терминации транскрипции и полиаденилирования.
5. Химерный ген по п.4, где указанный промотор является конститутивным промотором, семя-специфичным промотором, стебле-специфичным промотором или волокно-специфичным промотором.
6. Клетка-хозяин, содержащая химерный ген по п.4.
7. Трансгенное растение, содержащее химерный ген по п.4 или часть указанного растения.
8. Способ получения трансгенного растения по п.7, включающий:
 - (a) получение химерного гена по п.4;
 - (b) встраивание указанного химерного гена в растение.
9. Способ изменения по меньшей мере одного свойства волокна в растении, продуцирующем волокна, или укрепления клеточных стенок растения, включающий встраивание химерного гена по п.4 в указанное растение и обеспечение экспрессии указанного химерного гена, где указанное свойство волокна выбирают из прочности волокна и устойчивости к ферментативному расщеплению.
10. Способ по п.9, где укрепление клеточных стенок растения приводит к укреплению его стебля, повышению устойчивости к полеганию и повышению устойчивости к инфицированию патогенами.
11. Способ по п.9, включающий выращивание указанного растения до получения семян.
12. Способ получения целлюлозного материала с присоединенным ксилоглюканом (ксилоглюкановым олигосахаридом), включающий приведение целлюлозного материала в контакт с эффективным количеством белка по п.1 в присутствии ксилоглюкана (ксилоглюканового олигосахарида) или в присутствии ксилоглюкана (ксилоглюканового олигосахарида), ковалентно связанного с органической или неорганической молекулой.
13. Способ получения целлюлозного материала, включающий получение растения по п.7 и сбор указанного растения или его части и выделение целлюлозного материала из указанного собранного растения или части растения.
14. Способ по п.12, где целлюлозный материал применяется для получения ткани, бумаги, материала упаковки, строительного материала, загустителей, медицинского перевязочного материала, целлофана, диализных трубок и смолы для хроматографических колонок.
15. Способ получения белка по п.1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.6 и выделение продуцируемого белка.
16. Способ производства пищевого, кормового или промышленного продукта, включающий:
 - a) получение растения или его части по п.7 и
 - b) получение пищевого, кормового или промышленного продукта из растения или его части, где:
 - a) пищевой или кормовой продукт является маслом, мукой крупного помола, зерном, крахмалом, мукой или белковым продуктом; а
 - b) промышленный продукт является биотопливом, волокном, промышленными химикатами, фармацевтическим или нутрицевтическим средством.



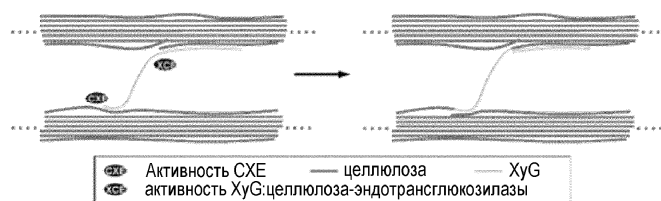
Фиг. 1



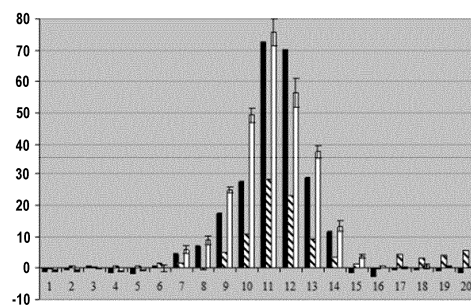
Фиг. 2



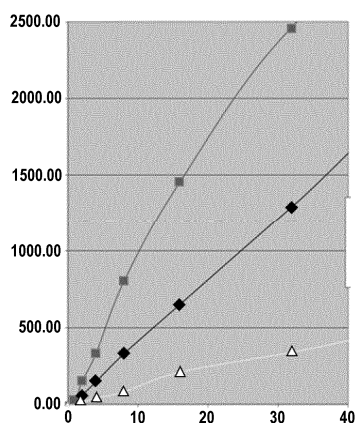
Фиг. 3



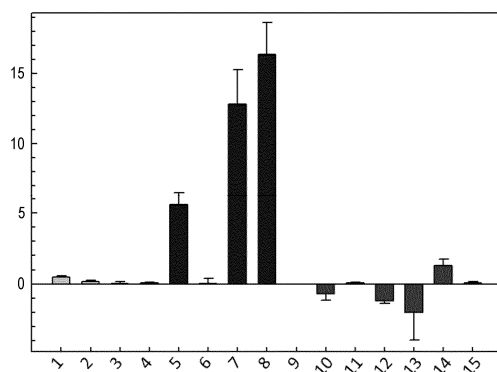
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

A)

```

SEQ ID NO 1      1  -----ATGCTGGGCTCTGGTG----
SEQ ID NO 5      1  ATGAAGAAG-----AAGATTGGAATGGTGCTGC
SEQ ID NO 7      1  ATGAAGAAGAAGACCGCGTCGATGCTGGGTTTGGCG----

SEQ ID NO 1      16  --TTTGGAATGTTGGTGATCATGCTGGCGTCTCCAAAATT
SEQ ID NO 5      29  TTTTGGGGCTTTTCATGATCATCATAGCGTCTCCAA---
SEQ ID NO 7      37  --TTTGGGATGTTGTTGATCATGCTGGCGTCTCCAAAATT

SEQ ID NO 1      54  AGCAATGGCAGGTTTCTATGGGGACTTTCAGGTAGAACCG
SEQ ID NO 5      66  AGCAGAGGCAAATTTCTATCAAGATTTTCGTCGTAGTTACA
SEQ ID NO 7      75  AGCAATAGCAGGTTTCTATGAGGACTTTGACGTAGATCCA

SEQ ID NO 1      94  GTTCCCGACCCGTCGATAATCCAAGCGATAGCCTCCTCC
SEQ ID NO 5      106 GTCCTGACCATGTCCAAATCCTTAATGATAACCTCCTCC
SEQ ID NO 7      115 CCTCCGACCCGTCGATAATCCAAGTGATAGCCTCCTCG

SEQ ID NO 1      134 AACTCACCATGGATAAGAACTCTGGTGGCTCAGTTGTCTC
SEQ ID NO 5      146 AGCTTACCATGGATAAGAATACTGCTAGCTCAATTAGCTC
SEQ ID NO 7      155 AACTCACCATGGATAAGAACTCTGGTAGCACAGTTGTCTC

SEQ ID NO 1      174 CAAAAGTAATTATCTGTTTGGCTACTTCAACATGAAGATG
SEQ ID NO 5      186 CACCAGTAAATACCTGTTTGGCTACTTCAACATGAGGATG
SEQ ID NO 7      195 CACCCGTAATATCTGTTTGGCTACTTCAACATGAAGATG

SEQ ID NO 1      214 AAGCTCATATCAGGAAACTCTGCAGGGACAGTAACCACAT
SEQ ID NO 5      226 AAGCTCATAGCAGGCAACTCTGCAGGGACAGTGACCACCT
SEQ ID NO 7      235 AAGCTCATATCAGGCAACTCTGCAGGGACAGTAACCACAT

SEQ ID NO 1      254 TCTATATCTTCTCTGATGAAGCAAACACGATGAGATAGA
SEQ ID NO 5      266 TCTATCTCTTCTCCAGTGAACCAACCATGATGAGCTAGA
SEQ ID NO 7      275 TCTATATCTTCTCTGAGGAAGCAAACACGATGAGATAGA

SEQ ID NO 1      294 CTTTGAGTTCCTTGGCAACTATTCAGGGGATCCTTATCTT
SEQ ID NO 5      306 CTTTGAGTTCCTTGGCAATCTTCAGGGGAACCTTATGTT
SEQ ID NO 7      315 CTTTGAGTTCCTTGGCAACTATTCAGGGGATCCTTATCTT

SEQ ID NO 1      334 TTGCATACTAATATTTTGAAGTGGTGTGGAAATAGAG
SEQ ID NO 5      346 TTGCATACAAATGTTTTTGAAGTGGTGTGGAAATAGAG
SEQ ID NO 7      355 TTGCATACTAATATTTTGAAGTGGTGTGGAAATAGAG

SEQ ID NO 1      374 AACACAATTTTTCTGTGGTTTGACCCCTACAGCTGACTT
SEQ ID NO 5      386 AACACAATTTTTCTGTGGTTTGACCCCTACAGCTGACTT
SEQ ID NO 7      395 AACACAATTTTTCTGTGGTTTGACCCCTACAGCTGACTT

```

```

SEQ ID NO 1 414 CCATGATTATACAATAATTTGGAACCCCTCAACAAATATTG
SEQ ID NO 5 426 CCACGACTATACAATAATTTGGAACCCCTCAACAAGTATTG
SEQ ID NO 7 435 CCATGATTATACAATAATTTGGAACCCCTCAACAAATATTG

SEQ ID NO 1 454 TTTCTTGTTGATGGAAGGGCTGTTAGATCTTTTCCGAATA
SEQ ID NO 5 466 TTTGTTGTTGATGGAAGGACTGTTAGATCTTTCCCAATA
SEQ ID NO 7 475 TTTCTTGTTGATGGAAGGGCTGTTAGATCTTTTCCGAATA

SEQ ID NO 1 494 ATCAGCCTATAGCTCTCCCTTACTTAAAAAGTCAATGGAT
SEQ ID NO 5 506 ATGAGGCTATAGGTGTCCCTTACTTAAAAAGTCAATGGAT
SEQ ID NO 7 515 ATGAGGCTATAGGTGTCCCTTACTTAAAAAGTCAATGGAT

SEQ ID NO 1 534 GAATGTACATTTAAGTCTTTGGAATGGCGAGACTTGGGCC
SEQ ID NO 5 546 GAATGTATATGCAAGCCTTTGGAATGGTGAGTCTTGGGCC
SEQ ID NO 7 555 GAATGTACATTTAAGTCTTTGGAATGGCGAGACTTGGGCC

SEQ ID NO 1 574 AACTAGGAGGGTTGAGAAGGATAGATTGGAATTCAGCCC
SEQ ID NO 5 586 AACTAGGAGGGCTGATAAAGATAGATTGGAGTGTATCCC
SEQ ID NO 7 595 AACTAGGAGGGTTGAGAAGGATAGATTGGAATTCAGCCC

SEQ ID NO 1 614 CTTTGTAGCTTCCTATTCTACTTTTGTAGGAGACTCATG
SEQ ID NO 5 626 CTTTGTGGCTTCCTATGCTGATTTTGCAGCAGACTCATG
SEQ ID NO 7 635 CTTTGTAGCTTCCTATTCTACTTTTGTAGGAGACTCATG

SEQ ID NO 1 654 CTTGATAGCGCAGATTCCCGTGCATGGCCTCAAATGG
SEQ ID NO 5 666 CTTTGATAGTGCAGATTCTCATGCATGGCCCAAAGTGG
SEQ ID NO 7 675 CTTGATAGCGCAGATTCCCGTGCATGGCCTCAAATGG

SEQ ID NO 1 694 TGAACCAAGCTGCATATCAATCTTTAAGCACAAAGTGATG
SEQ ID NO 5 706 TGAACCAACCTGCATATCAATTTTAAAGCACAAATGATG
SEQ ID NO 7 715 TGAACCAAGCTGCATATCAATCTTTAAGCACAAAGTGATG

SEQ ID NO 1 734 CCAGCAGTATTCAATGGGTTAGGGAAAATTATCTCAAATA
SEQ ID NO 5 746 CAAGCAGTATTCAATGGGTTAGGGCAAATTATCTCAAATA
SEQ ID NO 7 755 CCAGCAGTATTCAATGGGTTAGGGCAAATTATCTCAAATA

SEQ ID NO 1 774 TGACTATTGTTATGATACAAAACCTCTATCCGAACGGCTTT
SEQ ID NO 5 786 CGACTATTGTTATGATACGGAACCTCTATCC--AATCC--T
SEQ ID NO 7 795 TGACTATTGTTATGATACAAAACCTCTATCCGAACGGCTTT

SEQ ID NO 1 814 CCCAGAGAATGCTCAAACCGTGGTTTCTAG
SEQ ID NO 5 823 CCCATCGAATGTGCAACCGTGGCTTCTAG
SEQ ID NO 7 835 CCCAGCGAATGCTCAAACCGTGGTTTCTAG

B)
SEQ ID NO 2 1 -----MLGLVF--GMLVIMLASPKLAMAGFYGDFQVEP
SEQ ID NO 6 1 MKK---KIGMVLLGLFMI I IASPK-AEANFYQDFVVVT
SEQ ID NO 8 1 MKKKTASMLGLAF--GMLLIMLASPKLAIAGFYEDFDVDP

SEQ ID NO 2 32 VPDHVIIQSDSLLQLTMDKNSSGGSVVSKSNYLFGYFNMKM
SEQ ID NO 6 36 APDHVQIILNDNLLQLTMDKNTGSSISSTSKYLFGYFNMRM
SEQ ID NO 8 39 PPDHVIIQSDSLLQLTMDKNSSGTSVVSTRKYLFGYFNMKM

SEQ ID NO 2 72 KLISGNSAGTVTTFYIFSEANHDEIDFEFLGNYSGBPYP
SEQ ID NO 6 76 KLIAGNSAGTVTTFYIFSSEPNHDELDFEFLGNLSGEPYV
SEQ ID NO 8 79 KLISGNSAGTVTTFYIFSEANHDEIDFEFLGNYSGBPYP

SEQ ID NO 2 112 LHTNIFASGVGNREQQFFLWFDPTADFDHYTIIWNPQQIL
SEQ ID NO 6 116 LHTNVFASGVGNREQQFFLWFDPTDFHDYTI I WNPQQVL
SEQ ID NO 8 119 LHTNIFASGVGNREQQFFLWFDPTADFDHYTII WNPQQIL

SEQ ID NO 2 152 FLVDGRAVRSFPNNEAIGVPYLSQWMNVHLSLWNGETWA
SEQ ID NO 6 156 FVVDGRTVRSFPNNEAIGVPYLSQWMNVYASLWNGESWA
SEQ ID NO 8 159 FLVDGRAVRSFPNNEAIGVPYLSQWMNVHLSLWNGETWA

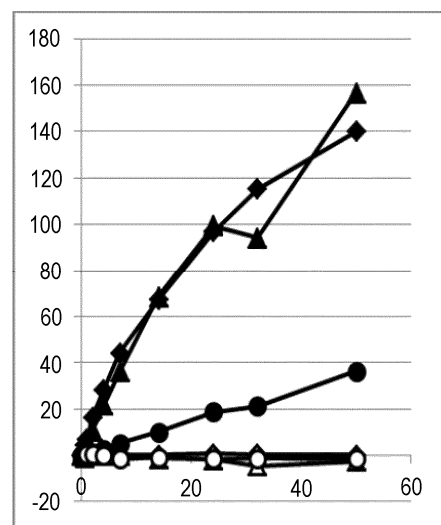
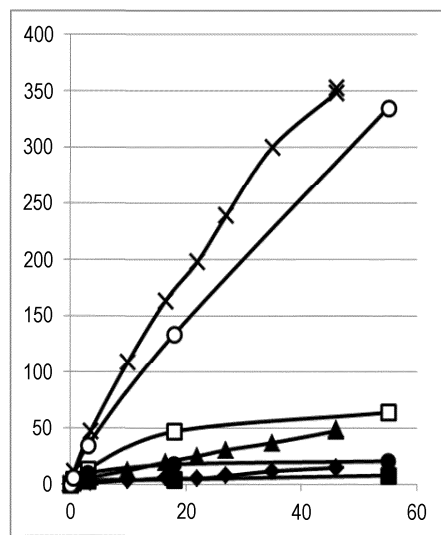
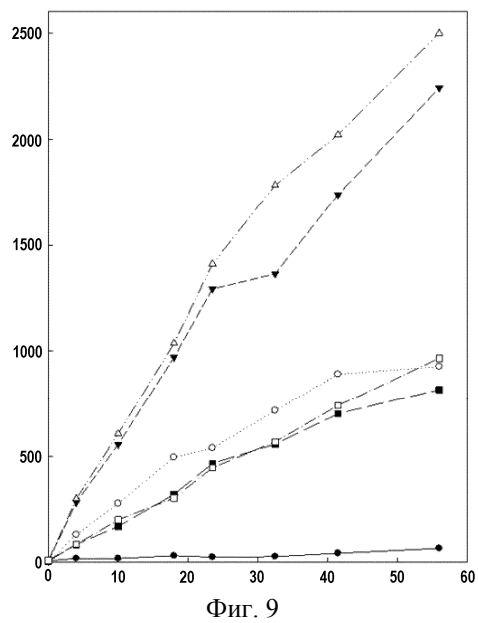
SEQ ID NO 2 192 TLGGLRRIDWNSAPFVASYSTFVGDSCFDSADSPCMASKW
SEQ ID NO 6 196 TLGGLIKIDWSVSPFVASYADFAADSCFDSADSSCMATKW
SEQ ID NO 8 199 TLGGLRRIDWNSAPFVASYSTFVGDSCFDSADSPCMASKW

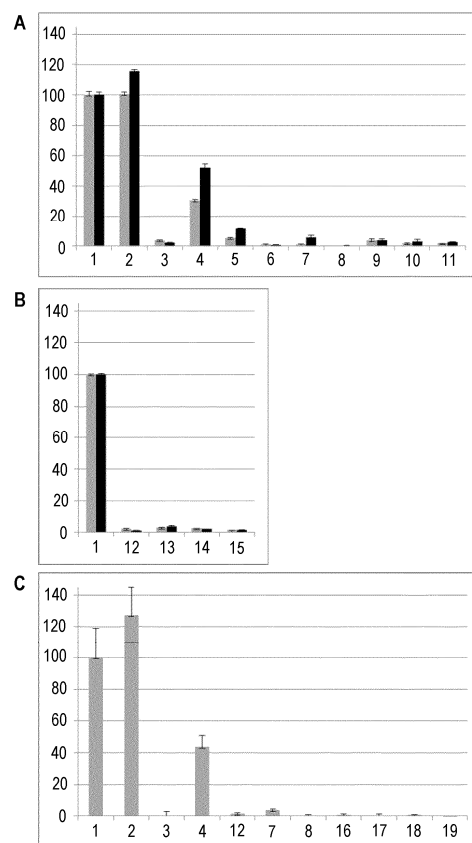
SEQ ID NO 2 232 WNQAAYQSLSTSDASSIQWVRENLYKYDYCYDTKLYPNGF
SEQ ID NO 6 236 WNQPAYQFLSTNDASSIQWVRANYLYKYDYCYDTELYPTP-
SEQ ID NO 8 239 WNQAAYQSLSTSDASSIQWVRANYLYKYDYCYDTKLYPNGF

SEQ ID NO 2 272 PRECSNRGF
SEQ ID NO 6 275 PIECQNRGF
SEQ ID NO 8 279 PSECSNRGF

```

Фиг. 8





Фиг. 12

