



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.14

(21) Номер заявки
201691953

(22) Дата подачи заявки
2015.04.10

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) БЕЛКИ ТОНОПЛАСТА, ФУНКЦИОНИРУЮЩИЕ КАК ПРОТОН/САХАР-АНТИПОРТЕРЫ, И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОЗЫ В ЗАПАСАЮЩЕМ САХАРОЗУ ОРГАНЕ РАСТЕНИЙ

(31) **10 2014 005 337.7**

(32) **2014.04.11**

(33) **DE**

(43) **2017.03.31**

(86) **PCT/DE2015/000170**

(87) **WO 2015/154741 2015.10.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КВС ЗААТ СЕ; ЗЮДЦУКЕР АГ (DE)

(72) Изобретатель:
**Кох Вольфганг, Зауэр Норберт,
Виршинг Петра, Поммерениг
Бенжамин, Нойхаус Эккехард,
Юнг Бенжамин, Флюгге Ульф-Инго,
Людевиг Франк, Вёстефельд Николе,
Мартен Ирен, Хедрих Райнер, Шульц
Александр (DE)**

(74) Представитель:
**Королева С.В., Емельянова В.А.,
Вашук Т.В. (BY)**

(56) DATABASE EMBL [Online], 17 October 2012 (2012-10-17), "TSA: Beta vulgaris Locus_1975 Transcript 18/21_Confidence 0.2 69 Length 3084 mRNA sequence.", XP002743849, retrieved from EBI accession no.EM_TSA:JP489061, Database accession no. JP489061, sequence

ALEXANDER SCHULZ ET AL.: "Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2", THE PLANT JOURNAL, vol. 68, no. 1, 27 October 2011

(2011-10-27), pages 129-136, XP055210435, ISSN: 0960-7412, DOI:10.1111/J.1365-313X.2011.04672.x, abstract, page 134, right-hand column, paragraph 2, figure 4

WINGENTER KARINA ET AL.: "Increased Activity of the Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signaling, and Seed Yield in Arabidopsis", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 154, no. 2, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 665-677, XP009145890, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US ISSN: 0032-0889, DOI:10.1104/PP.110.162040

ENDLER ANNE ET AL.: "Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach", PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 141, no. 1, May 2006 (2006-05), pages 196-207, XP002743850, ISSN: 0032-0889

WO-A1-2011120549

KR-A-20110085729

KR-A-20110085732

KUHN C. ET AL.: "Sucrose transporters of higher plants", CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY, vol. 13, no. 3, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 287-297, XP027081073, QUADRANT SUBSCRIPTION SERVICES, GB ISSN: 1369-5266, DOI:10.1016/J.PBI.2010.02.001 [retrieved on 2010-03-18]

LUDEWIG FRANK ET AL.: "Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 4, 231, 2 July 2013 (2013-07-02), pages 1-16, XP002743851, DOI: 10.3389/fpls.2013.00231

(57) Изобретение относится к белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахар-антипортеры, в частности белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахарозные антипортеры, кодирующим их нуклеотидным последовательностям, а также к использованию их для получения трансгенных растений с повышенной концентрацией сахарозы. Изобретение также касается способов получения трансгенных растений с повышенной концентрацией сахарозы, повышения концентрации сахарозы у растений и идентификации растений, подходящих для накопления более высокой концентрации сахарозы.

Настоящее изобретение относится к области промышленного производства сахара из сельскохозяйственных культур и касается увеличения выхода сахарозы при их выращивании. В частности, изобретение относится к белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахар-антипортеры. Более конкретно, изобретение относится к белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахарозные антипортеры, и к кодирующим их аминокислотам, а также касается их использования для повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе сельскохозяйственных растений.

С одной стороны, сахар - это собирательное название всех сладких на вкус моно- и дисахаридов, а с другой стороны - общее торговое название для дисахарида сахарозы. Сахароза - это обычный бытовой сахарный песок или гранулированный сахар, известный также как сукроза. Сахароза представляет собой димер, состоящий из молекулы α -D-глюкозы и молекулы β -D-фруктозы, соединенных α , β -1,2-гликозидной связью.

Сахароза образуется в растениях в результате фотосинтеза. Биосинтез сахарозы происходит в цитоплазме растительных клеток. При этом два триозофосфата, глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, являющиеся конечным результатом ассимиляции углерода при фотосинтезе (цикл Кальвина), экспортируются из хлоропласта в цитозоль. В цитозоле растительной клетки из триозофосфатов образуются моносахариды UDP-глюкоза и фруктозо-6-фосфат. При этом первый фруктозо-1,6-бисфосфат образуется в ходе реакции конденсации между глицеральдегид-3-фосфатом и дигидроксиацетонфосфатом. Фруктозо-1,6-бисфосфат затем дефосфорелируется и превращается во фруктозо-6-фосфат. Фруктозо-6-фосфат может изомеризоваться в глюкозо-6-фосфат, который после предварительной изомеризации с образованием глюкозо-1-фосфата вступает в реакцию с уридинтрифосфатом (UTP) с образованием уридиндифосфат-глюкозы (UDP-глюкозы).

Последующая конденсация UDP-глюкозы и фруктозо-6-фосфата с образованием сахарозо-6-фосфата катализируется ферментом сахарозофосфатсинтазой. Необходимая энергия обеспечивается за счет элиминирования уридиндифосфата (UDP). В конечном итоге фосфатный остаток сахарозо-6-фосфата расщепляется в ходе необратимой реакции ферментом сахарозофосфатфосфатазой с образованием сахарозы.

Сахароза представляет собой нередуцирующий дисахарид и поэтому является главным транспортным сахаром у растений. Сахароза синтезируется заново в листьях растений и транспортируется по флоэме в запасающие органы растений, где она накапливается в вакуолях растительных клеток и используется в качестве источника питания и энергии.

Важнейшими культурами для промышленного производства сахарозы являются сахарная свекла (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum officinarum*) и сахарная пальма (*Arenga pinnata*, синоним: *Arenga saccharifera* Labil., главным образом, в Индонезии). В небольшом количестве сахарозу также получают из сока дерева сахарного клена (*Acer saccharum*). Эти растения используются для производства сахарозы, потому что ее содержание в этих растениях чрезвычайно высокое.

У сахарного тростника содержание Сахаров - главным образом сахарозы - в мякоти стебля растения (запасающем сахарозу органе растения) обычно составляет 10-20%. Тростниковый сахар получают путем кристаллизации и очистки сока растения после отжима сырого тростника.

Сахарная свекла - это двулетнее растение, в первый год развития накапливающее запас сахара в корнеплоде, который на второй год развития используется в качестве питания для цветения растения. Сахар обычно получают экстракцией свекольной стружки с применением воды. Экстракт может затем обрабатываться оксидом кальция для осаждения кислот в растительном сырье, таких как щавелевая кислота или винная кислота, и белков. Избыточный оксид кальция отделяют путем введения диоксида углерода. Последующим выпариванием воды из раствора сахара под вакуумом получают сироп. Кристаллизующийся сахар отделяют от остающегося коричневого сиропа центрифугированием. Остаток - меласу используют на корм скоту или для ферментации спирта. Пурификацию (очистку) сахара осуществляют путем перекристаллизации, фильтрования и выпаривания под вакуумом.

За годы выращивания запасающих сахарозу растений удалось достичь существенного увеличения урожайности запасающих сахарозу органов и повышения концентрации сахарозы. Например, в выращиваемых в настоящее время сортах сахарной свеклы для производства сахара концентрация сахарозы в корнеплодах составляет 15-20% сырого веса. Тем не менее, полученные концентрации сахарозы все еще далеко не удовлетворительные.

Целью настоящего изобретения является получение растений с повышенной концентрацией сахарозы и разработка способа повышения концентрации сахарозы в растениях, особенно в сахарном тростнике и в сахарной свекле.

В документе WO 2010/072210 A1 раскрывается способ повышения выхода сахарозы при сельскохозяйственном выращивании сахарной свеклы. Указанный метод касается использования сахарной свеклы или сахарного тростника, генетическое строение которых направлено на уменьшение ферментативной активности инвертазы. Для этого нуклеиновая кислота, которая подходит для уменьшения ферментативной активности инвертазы в растительной клетке, используется для формирования запасающего сахарозу органа растения, в котором происходит повышение концентрации сахарозы по сравнению с концентрацией сахарозы в немодифицированном контрольном запасающем сахарозу органе того же генотипа в

сравниваемой стадии развития.

Растительные вакуоли играют главную роль в долгосрочном и краткосрочном запасании Сахаров, так как вакуоль, как органелла, занимает 90% объема растительной клетки с фотосинтетической активностью (Martinola, E. и соавт. (2007) "Вакуолярные транспортеры и их основная роль в метаболизме растений," J. Exp. Bot. 58: 83-102). Поэтому вакуоли, вследствие своего размера, имеют особое значение для запасания Сахаров (Neuhaus, H.E. (2007) "Транспорт первичных метаболитов через вакуолярную мембрану растительной клетки" FEBS: Lett 581: 2223-2226). В запасующих тканях, таких как стержневой корень сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) и мякоть стебля сахарного тростника (*Saccharum officinarum*), накапливаются большие количества сахарозы в вакуолях клеток их запасующих органов и используются в качестве источника энергии в ходе метаболизма растений.

У различных однодольных и двудольных растений, таких как *Medicago* (№ идентификации AC131026), *Vitis vinifera* (№ идентификации AAX47312) и рис (*Oryza sativa*; № идентификации Os02g13560), обнаружены белки, отвечающие за транспорт сахара из цитоплазмы растительной клетки в ее вакуоль. У растения *Arabidopsis* идентифицирован ген, чей белковый продукт является транспортером сахара. При этом он локализуется в вакуолярной мембране фотосинтетически активных клеток и может импортировать глюкозу из цитозоля в вакуоль (Wormit, A. и соавт. (2006) "Молекулярная идентификация и физиологическая характеристика нового транспортера моносахаридов из *Arabidopsis*, обеспечивающего транспорт сахара в вакуоль", *Plant Cell* 18:3476-3490). Этот транспортный белок, известный как трансмембранный транспортер моносахаридов (TMT), локализуется в вакуолярной мембране - тонопласте. Трансмембранный транспортер моносахаридов (TMT) включает в себя три изоформы *Arabidopsis thaliana*, названные AtTMT1, AtTMT2 и AtTMT3. Гены AtTMT1 и AtTMT2 имеют ткане- и клеткоспецифический характер экспрессии, а ген AtTMT3 экспрессируется очень слабо. Нокаутные гены TMT показали, что модифицированные таким образом растения накапливали значительно меньше глюкозы и фруктозы в своих вакуолях по сравнению с растениями дикого типа. Однако, что касается накопления сахарозы, разницы между растениями дикого типа и растениями с нокаутными генами TMT не было обнаружено.

Электрофизиологические исследования трансмембранного транспортера моносахаридов TMT1 из *Arabidopsis thaliana* показали, что он представляет собой протондвижимый антипортер глюкозы и сахарозы, транспортирующий глюкозу и сахарозу через вакуолярную мембрану с приблизительно одинаковой специфичностью (Schulz, A. и соавт. (2011) "Протондвижимый симпорт и антипорт сахарозы обеспечивается вакуолярными транспортерами SUC4 и TMT1/2", *The Plant Journal* 68: 129-136). В той же статье транспортный белок SUC4 из *Arabidopsis thaliana*, участвующий в переносе сахарозы, характеризуется как протон/сахарозный симпортер, который, по-видимому, также локализуется в вакуолярной мембране.

В документе WO 2011/120549 A1 показано, что увеличение урожайности семян, повышение содержания белков и масла в семенах, а также содействие росту однодольных и двудольных растений на раннем этапе может достигаться у растений путем сверхэкспрессии моносахаридного транспортера AtTMT1 тонопласта. Накопление сахарозы в запасующем органе не раскрывается.

На фоне этого уровня техники в основе настоящего изобретения лежит задача идентификации белков, отвечающих за импорт сахаров в вакуоли клеток стержневых корней сахарной свеклы, в частности белков, ответственных за импорт сахарозы в вакуоли клеток стержневых корней сахарной свеклы, действие которых является специфичным для сахарозы. Наряду с идентификацией этих белков, в частности наряду с идентификацией этого первого сахароза-специфичного белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, и нуклеотидных последовательностей, кодирующих эти белки, обеспечиваются способы возделывания и/или молекулярно-генетические способы повышения концентрации сахарозы в растениях и, таким образом, также растения с повышенной концентрацией сахарозы.

Согласно первому аспекту изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер. Предпочтительно указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, который является специфичным для сахарозы. В дальнейшем специфичный для сахарозы белок, функционирующий как протон/сахар-антипортер, называется протон/сахарозный антипортер.

Согласно второму аспекту изобретение относится к рекомбинантному гену, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, предпочтительно протон-сахарозный антипортер тонопласта. Молекула нуклеиновой кислоты может быть оперативно связана по меньшей мере с одним регуляторным элементом.

Согласно третьему аспекту изобретение относится к вектору или мобильному генетическому элементу, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или рекомбинантный ген согласно второму аспекту.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, предпочтительно в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту, либо вектор или мобильный

генетический элемент согласно третьему аспекту.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к белку, функционирующему как протон/сахар-антипортер, который предпочтительно является специфичным для сахарозы, или как протон/сахарозный антипортер тонопласта.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к трансгенной растительной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту, а также к трансгенному растению или его частям, содержащим по меньшей мере одну такую трансгенную растительную клетку.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к семенам трансгенного растения согласно предыдущему аспекту, при этом семена содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способам получения трансгенных растений.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способам повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способам идентификации растения, подходящего для генерирования повышенной концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к олигонуклеотидам, которые подходят для использования в качестве молекулярных маркеров, способных детектировать молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к антителам, способным детектировать белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, который предпочтительно является специфичным для сахарозы, предпочтительно как протон/сахарозный антипортер.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к использованию белков тонопласта, функционирующих как протон/сахар-антипортеры для повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения.

На фиг. 1 показана таблица идентичности и сходства между аминокислотными последовательностями трех паралогичных трансмембранных белков-транспортёров моносахаридов (TMT) *Arabidopsis thaliana* и нуклеотидными последовательностями четырех паралогичных трансмембранных белков-транспортёров сахаров (TST) *Beta vulgaris*.

На фиг. 2 показана кладограмма, иллюстрирующая филогенетические взаимоотношения трех паралогичных трансмембранных белков-транспортёров моносахаридов (TMT) *Arabidopsis thaliana* и четырех паралогичных трансмембранных белков-транспортёров сахаров (TST) *Beta vulgaris*.

На фиг. 3 показана гистограмма концентрации сахарозы в стержневых корнях двух сортов сахарной свеклы различного возраста.

На фиг. 4 представлена гистограмма, показывающая относительные количества мРНК четырех паралогичных генов TST *Beta vulgaris* в двух различных сортах сахарной свеклы разных сроков развития.

На фиг. 5 показана гистограмма, иллюстрирующая концентрацию различных сахаров в листьях сахарной свеклы сорта "Belladonna KWS" в разных стадиях развития.

На фиг. 6 представлена гистограмма, показывающая относительные количества мРНК четырех паралогичных генов BvTST в листьях сахарной свеклы сорта "Belladonna KWS" в разных стадиях развития.

На фиг. 7 показана гистограмма, иллюстрирующая изменение текущей плотности, индуцируемой различными сахарами (сахаридами) в вакуолях транзигентно трансформированных мезофильных клеток.

Изобретатели идентифицировали белок, называемый здесь BvTST2.1, как один из наиболее избыточных белков вакуолярной мембраны клеток стержневого корня сахарной свеклы. Они сделали удивительное открытие, что белок BvTST2.1 способен вызывать специфичный импорт сахарозы из цитозоля в вакуоли растительных клеток в качестве мембранного транспортёра сахаров. Поэтому этот белок или белки, выполняющие те же функции, не только представляют собой транспортёры сахаров тонопласта (TST), но также называются транспортёры сахарозы тонопласта, либо протон/сахарозные антипортеры тонопласта, либо протонсахарозные антипортеры тонопласта, где сокращение (Bv) означает *Beta vulgaris* - организм, в котором этот белок был первоначально идентифицирован. Изобретатели идентифицировали белок BvTST2.1 как высоко специфичный для сахарозы протон/сахар-антипортер, который является первым известным белком-представителем семейства транспортёров Сахаров этого растения. Кроме того, были успешно идентифицированы три другие паралогичные изоформы - BvTST1, BvTST2.2 и BvTST3, которые, по-видимому, функционально связаны с известными белками TMT из *Arabidopsis*.

Основываясь на идентификации этого нового сахароза-специфичного антипортера, изобретатели также идентифицировали нуклеотидные последовательности, кодирующие белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, и другие изоформы.

Поэтому согласно первому аспекту изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер.

Согласно варианту осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок

тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, включающей:

а) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2;

б) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей согласно а);

с) молекулу нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты согласно а) или б);

д) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого обладает по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; и

е) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида SEQ ID NO: 1.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, выбираемую из группы, включающей:

а) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4, 6 или 8, или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4, 6 или 8;

б) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей согласно а);

с) молекулу нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с молекулой нуклеиновой кислоты согласно а) или б);

д) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3, 5 или 7, или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого обладает по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, 5 или 7; и

е) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую гомолог, аналог или ортолог полипептида SEQ ID NO: 3, 5 или 7.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты, имеющая нуклеотидную последовательность" включает не только молекулы нуклеиновой кислоты, нуклеотидные последовательности которых содержат подробно описанные выше последовательности, но также молекулы нуклеиновой кислоты, которые в дополнение к подробно описанным выше нуклеотидным последовательностям имеют по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность или нуклеотидные последовательности.

Согласно альтернативному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7. Однако молекула нуклеиновой кислоты может также кодировать аминокислотную последовательность, в которой по меньшей мере один аминокислотный остаток аминокислотной последовательности заменен аминокислотой, сходной по химическим свойствам (консервативная или полуконсервативная замена аминокислоты). Консервативная замена аминокислоты - замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, сходную по химическим свойствам. Полуконсервативная замена аминокислоты - замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, обладающую сходным стерическим соответствием. Предпочтительно, чтобы замена не влияла на функциональность белка. Примерами аминокислотных замен являются Asp и Glu, Leu и Ile, Ala и Val, Arg и Lys и Phe и Trp.

Согласно альтернативному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения нуклеотидные последовательности нуклеиновых кислот и/или аминокислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями, обладают по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью с нуклеотидной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8, либо с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7.

Используемый здесь термин "гибридизировать" означает гибридизацию с использованием стандартных методов, описанных Sambrook и соавт. (1989) в "Молекулярное клонирование, лабораторное руководство" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк), предпочтительно в жестких условиях. Примером условий жесткой гибридизации является гибридизация в 4×SSC при 65°C и последующая многократная отмывка в 0,1×SSC при 65°C в течение около 1 ч. Примером условий менее жесткой гиб-

ридизации является гибридизация в $4\times\text{SSC}$ при 37°C и последующая многократная отмывка в $0,1\times\text{SSC}$ при комнатной температуре. Термин "условия жесткой гибридизации" может также означать гибридизацию при 68°C в $0,25\text{ M}$ фосфат натрия, $\text{pH } 7,2$, 7% SDS, 1 mM EDTA и 1% BSA в течение 16 ч и последующую двукратную отмывку в $2\times\text{SSC}$ и $0,1\%$ SDS при 68°C .

Для целей настоящего изобретения "специфичный для сахарозы" или "высокоспецифичный для сахарозы" или "сахароза-специфичный транспорт" или "сахароза-высокоспецифичный транспорт" или "специфичность для сахарозы" или "специфичность сахарозы" означает, что специфичность белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для сахарозы превышает его специфичность для других видов Сахаров по меньшей мере в 5 раз, 10 раз или 15 раз, предпочтительно по меньшей мере в 18 раз, 20 раз, 22 раза, 24 раза, 26 раз или 28 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере 31 раз, по меньшей мере 32 раза, по меньшей мере 33 раза, по меньшей мере 34 раза, по меньшей мере 35 раз, по меньшей мере 36 раз, по меньшей мере 37 раз, по меньшей мере 38 раз или по меньшей мере 39 раз, и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 40 раз. Кроме того, это может также означать, что специфичность белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для сахарозы превышает его специфичность для моносахарида, такого как глюкоза или фруктоза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере 10 раз или 15 раз, предпочтительно по меньшей мере в 18 раз, 20 раз, 22 раза, 24 раза, 26 раз или 28 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере 31 раз, по меньшей мере 32 раза, по меньшей мере 33 раза, по меньшей мере 34 раза, по меньшей мере 35 раз, по меньшей мере 36 раз, по меньшей мере 37 раз, по меньшей мере 38 раз или по меньшей мере 39 раз, и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 40 раз.

Для целей настоящего изобретения "гомолог" означает белок того же филогенетического происхождения, "аналог" означает белок, выполняющий ту же функцию, но имеющий различное филогенетическое происхождение, и "ортолог" означает белок, полученный из другого вида, который выполняет ту же функцию.

Согласно второму аспекту изобретение относится к рекомбинантному гену, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, предпочтительно кодирующую белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер. Молекула нуклеиновой кислоты может быть оперативно связана по меньшей мере с одним регуляторным элементом.

Термин "регуляторный элемент" означает нуклеотидные последовательности, которые не являются частью белок-кодирующей нуклеотидной последовательности, но опосредуют экспрессию белок-кодирующей нуклеотидной последовательности. Например, регуляторные элементы включают промоторы, цис-регуляторные элементы, энхансеры, интроны или терминаторы. В зависимости от вида регуляторный элемент локализуется на молекуле нуклеиновой кислоты до (т.е. на 5'-конце от) или после (т.е. на 3'-конце от) белок-кодирующей нуклеотидной последовательности. Регуляторные элементы проявляют функциональную активность в живой растительной клетке.

Термин "оперативно связанный" означает, что регуляторный элемент связывается с белок-кодирующей нуклеотидной последовательностью, т.е. располагается относительно белок-кодирующей последовательности на, например, молекуле нуклеиновой кислоты таким образом, что в живой клетке имеет место процесс экспрессии белок-кодирующей нуклеотидной последовательности под контролем этого регуляторного элемента.

Для целей настоящего изобретения "промотор" представляет собой нуклеотидную последовательность, регулирующую экспрессию гена, который обычно локализуется на 5'-конце от гена и опосредует начало транскрипции РНК полимеразы путем взаимодействия с определенными ДНК-связывающими белками. Примерами промоторов, которые проявляют функциональную активность в растительных клетках, являются конститутивные промоторы, такие как вирусный промотор CaM35S, двойной промотор CaM35S, или растительные промоторы, такие как убиквитиновые промоторы, описанные в европейском патенте № 0305668 и в патенте США № 6528701. Кроме того, могут использоваться промоторы, которые, например, проявляют специфичную активность на определенных стадиях развития или которые индуцируются факторами окружающей среды, такими как биотический или абиотический стресс, либо которые являются тканеспецифичными. Особенно подходят те промоторы, которые проявляют повышенную специфичность в отношении запасящего сахарозу органа или его частей, т.е. промоторы, которые, в частности, активны в этом запасящем сахарозу органе или его частях. Например, что касается сахарной свеклы, таким промотором может быть промотор, специфичный для корней, или промотор, специфичный для стержневого корня. Специалисту в данной области техники такие промоторы известны из предыдущего уровня техники: документ WO 02/40687, Oltmanns, H. и соавт. (2006) "Промоторы, специфичные для стержневых корней, вызывают экспрессию тканеспецифичного гена внутри запасящего корня сахарной свеклы", *Planta* 224: 485-495, Noh, Seol Ah и соавт. (2012) "SRD1-промотор сладкого картофеля вызывает специфичную для корней, стержневых корней и клубней экспрессию у *Arabidopsis*, моркови и картофеля" *Transgenic research* 21: 265-278. Что касается сахарного тростника, предпочтительно использовать промоторы, специфичные для стеблей, такие как промоторы, известные у Goshu Abraha, Tsion,

"Выделение и характеристика промоторного элемента, специфичного для стеблей, из сахарного тростника", дисс. Стелленбос: Стелленбосский университет, 2005. Govender, С. "Промоторы, специфичные для стеблей, из сорго и маиса для использования в сахарном тростнике", дисс. Стелленбос: Стелленбосский университет, 2008; и Mudge, S.R. и соавт. (2013) "В зрелых стеблях экспрессия сайленсинг-резистентного гена изомеразы сукрозы вызывает повышение уровня накопления изомальтулозы в сахарном тростнике", *Plant Biotechnology Journal* 1:502-509).

Подходящие промоторы включают также синтетические промоторы. Это созданные методами молекулярной биологии промоторы, которые в такой конфигурации в природе не встречаются. Синтетический промотор представляет собой минималистичный промотор, содержащий в дополнение к минимальному промотору только один или несколько выделенных, определенных цис-элементов. Эти цис-элементы являются сайтами связывания для ДНК-связывающих белков, таких как факторы транскрипции. Они выделены из природных промоторов, полученных из ранее выделенных цис-элементов или созданных технически методами случайной рекомбинации и соответствующим образом выделенных. В отличие от природного промотора синтетический промотор вследствие его менее сложного строения активируется только несколькими экзогенными и эндогенными факторами и поэтому более специфично регулируется.

"Минимальный промотор" или "кор-промотор" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая содержит сайты связывания для основного комплекса фактора транскрипции и позволяет РНК-полимеразе II начать аккуратную инициацию транскрипции. Характерными мотивами в последовательности минимального промотора являются ТАТА-бокс, инициаторный элемент (Inr), "элемент распознавания TFBII" (BRE) и "даунстрим кор-промоторный элемент" (OPE). Эти элементы могут встречаться в минимальном промоторе вместе или по отдельности. Минимальный промотор имеется в любом растительном, бактериальном, грибном или вирусном гене или мотивы в его последовательности доступны из любого растительного, бактериального, грибного или вирусного гена.

"Цис-элементы" представляют собой нуклеотидные последовательности, которые локализуются на той же молекуле нуклеиновой кислоты, что и подлежащая экспрессии нуклеотидная последовательность, кодирующая белок. Сами по себе цис-элементы не кодируют РНК или белок, и в направлении транскрипции они могут располагаться до или после подлежащей экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей белок. Цис-элементы, располагающиеся апстрим, т.е. до подлежащей экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, часто обеспечивают необходимые мотивы связывания, в частности, для факторов транскрипции, которые с другой стороны на молекулярном уровне вовлекаются как транс-действующие элементы (от лат. trans, "движение, направленное через, сквозь что-либо") в регуляцию транскрипции этого гена. Если дополнительно цис-элементы ингибируют транскрипцию, тогда они называются сайленсерами. Цис-элементы, которые усиливают транскрипцию, называются энхансерами. Вся совокупность цис/транс активности промотора определяет интенсивность, с которой РНК-полимераза осуществляет транскрипцию.

Кроме того, промотор может быть химерным промотором и/или промотором, модифицированным цис-элементами. Модификация промотора может также означать инкорпорацию цис-элемента в промотор, например, в дополнение к уже естественно ассоциированному с промотором цис-элементу. Модификация также включает мультимеризацию цис-элемента, в частности, мультимеризацию естественно существующего цис-элемента. По сравнению с природным вариантом такой модифицированный промотор может обладать измененными свойствами в отношении, например, специфичности, уровня экспрессии или фоновой активности.

Терминаторы представляют собой нуклеотидные последовательности ДНК, которые обычно обозначают конец гена и ведут к терминации транскрипции.

Согласно альтернативному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, в частности, нуклеотидная последовательность, кодирующая белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер, и нуклеотидная последовательность по меньшей мере одного регуляторного элемента являются гетерологичными. Это означает, что они происходят от различных видов или не встречаются в природе в нужной комбинации у какого-либо вида.

Согласно третьему аспекту изобретения относится к вектору или к мобильному генетическому элементу, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность согласно первому аспекту, или рекомбинантный ген согласно второму аспекту.

В контексте настоящего изобретения вектор означает "транспортное средство" для молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту или рекомбинантного гена согласно второму аспекту, в частности, для переноса чужой нуклеиновой кислоты в живую клетку-получатель. Живая клетка-получатель может быть эукариотической или прокариотической клеткой. Векторы включают, например, плазмиды, космиды, искусственные дрожжевые хромосомы (YACs), искусственные бактериальные хромосомы (BACs) или искусственные хромосомы P1 (PACs), а также модифицированные вирусы, такие как аденовирусы, ретровирусы и фаги.

Мобильные генетические элементы представляют собой нуклеотидные последовательности, место-

положение которых в геноме организма является изменчивым. Например, мобильные генетические элементы включают самообеспечивающиеся нуклеотидные последовательности, такие как транспозоны, ретро элементы, инсерционные последовательности и интеины, а также интроны группы II, инсерционные плазмиды и некоторые бактериофаги, такие как фаг Mu.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к эукариотической клетке-хозяину или к прокариотической клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, а также вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту в качестве трансгена. Это означает, что молекула нуклеиновой кислоты, рекомбинантный ген и/или вектор или мобильный генетический элемент были инкорпорированы в клетку-хозяина, например, посредством трансформации или трансфекции. Примерами прокариотических клеток-хозяев являются бактерии рода *A. tumefaciens*, *E. coli* и *B. Subtilis*. Примерами эукариотических клеток-хозяев являются клетки дрожжей, такие как *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*, а также клетки животного или растительного происхождения.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахарозный антипортер. Этот антипортер является специфичным для сахарозы. Предпочтительно, белок кодируется молекулой нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Согласно варианту осуществления изобретения белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер, выбирают из группы белков, которые:

- a) имеют аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1;
- b) имеют аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;
- c) являются гомологом, аналогом или ортологом белка SEQ ID NO: 1.

Белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер согласно SEQ ID NO: 1, называемый также BvTST2.1, имеет аминокислотную последовательность длиной 735 аминокислот. Анализ гидрофобности показывает, что BvTST2.1 очевидно включает в себя 12 гидрофобных трансмембранных доменов и большую, центрально расположенную, гидрофильную петлю, соединяющую шестой и седьмой трансмембранные домены. Последовательность BvTST2.1 обладает самой высокой идентичностью с последовательностью белка 2 тонопласта, функционирующего как моносахаридный транспортер, из *Arabidopsis thaliana* (AtTMT2). Сходство этих двух аминокислотных последовательностей составляет 68%, а с учетом консервативных и полуконсервативных аминокислотных замен их идентичность достигает 84% (фиг. 1).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахар-антипортеры. Предпочтительно эти белки кодируются молекулой нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Согласно варианту осуществления изобретения белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, выбирают из группы белков, которые:

- a) имеют аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3, 5 или 7;
- b) имеют аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, 5 или 7;
- c) являются гомологом, аналогом или ортологом белка SEQ ID NO: 3, 5 или 7.

Белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер согласно SEQ ID NO: 3, называется также BvTST1, согласно SEQ ID NO: 5 - BvTST2.2 и согласно SEQ ID NO: 7-BvTST3.

Поскольку последовательность белка тонопласта BvTST2.1, функционирующего как протон/сахарозный антипортер, из *Beta vulgaris*, как и последовательности других белков тонопласта - BvTST1, BvTST2.2 и BvTST3, функционирующих как протон/сахар-антипортеры, также идентичны последовательностям белков-транспортеров из других растений, то белки тонопласта, функционирующие как протон/сахар-антипортеры, в частности, белки тонопласта, функционирующие как протон/сахарозные антипортеры, также включают белки, аминокислотная последовательность которых обладает по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7, а также ее гомологами, аналогами или ортологами. В контексте настоящего изобретения не имеет значения, являются ли эти белки природными продуктами видов, в которых они встречаются, или продуктами, которые не встречаются в природе, а созданы, например, посредством молекулярных генетических методов.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к трансгенной растительной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту в качестве трансгена, а также к трансгенному растению или его частям, содержащим по меньшей мере одну такую клетку. В контексте настоящего изобретения трансгенное растение или его части также содержат(ат) молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту в качестве трансгена.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к семенам трансгенного растения согласно предыдущему аспекту, характеризующимся тем, что они и, в частности, по меньшей мере их эмбриональная клетка содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту в качестве трансгена, рекомбинантный ген согласно второму аспекту в качестве трансгена, либо вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту.

Согласно варианту осуществления изобретения растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения. Согласно другому варианту осуществления изобретения растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения. Согласно еще одному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения растительные клетки представляют собой клетки растения, выбираемого из группы видов или родов, включающих *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* и *Sorghum* sp. Соответственно, согласно другому варианту осуществления изобретения трансгенное растение выбирают из группы, включающей *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* и *Sorghum* sp. Согласно еще одному другому варианту осуществления изобретения части трансгенного растения или семена трансгенного растения получают из группы растений, включающих *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* и *Sorghum* sp.

Согласно дополнительному и/или альтернативному варианту осуществления изобретения трансгенная растительная клетка, трансгенное растение или части трансгенного растения, предпочтительно являющиеся запасующим сахарозу органом растений, обладают повышенной концентрацией сахарозы по сравнению с изогенной растительной клеткой или растением, выращиваемым в сходных условиях. Кроме того, части растения могут быть связаны с целым и интактным растением или отделены от него. Такие части включают, например органы, ткани, клетки и семена растения.

Предпочтительно, чтобы повышенная концентрация сахарозы основывалась на повышенной концентрации сахарозы в вакуолях растения, в частности, в вакуоли по меньшей мере одной клетки запасующего сахарозу органа растения. Более предпочтительно, чтобы растение с повышенной концентрацией сахарозы обладало повышенным выходом сахарозы. В контексте настоящего изобретения выход сахарозы означает выход из запасующего сахарозу органа в расчете на единицу площади выращивания (например, 1 га) или в расчете на вес запасующего сахарозу органа с учетом содержания воды в запасующем сахарозу органе (предпочтительна нормализация в расчете на сырой вес или сухой вес).

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способу получения трансгенных растений, который состоит по меньшей мере из следующих этапов:

(а) инкорпорирование молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, рекомбинантного гена согласно второму аспекту и/или вектора или мобильного генетического элемента согласно третьему аспекту по меньшей мере в одну клетку растения и

(b) регенерация такого трансгенного растения из растительной клетки, полученной на этапе (а).

Согласно варианту осуществления изобретения получаемое этим способом трансгенное растение способно обеспечивать более высокий уровень концентрации сахарозы в вакуолях своих клеток, предпочтительно в вакуолях клеток своего запасующего сахарозу органа, по сравнению с контрольным изогенным растением при произрастании в сходных условиях.

Для целей настоящего изобретения "изогенные растения или контрольные растения" или "изогенные растительные клетки" означает те растения или растительные клетки, которые были использованы в качестве исходного материала для получения трансгенных растений или трансгенных растительных клеток. Таким образом, геномы трансгенных растений и/или растительных клеток, поскольку это генетически модифицированные растения или растительные клетки, не различаются, за исключением генов, перенесенных в результате генных технологий, и/или инкорпорированных нуклеотидных последовательностей.

Согласно дополнительному и/или альтернативному варианту осуществления изобретения в трансгенном растении экспрессируется или сверхэкспрессируется нуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один белок, функционирующий как протон/сахар-антипортёр, по меньшей мере в одной клетке.

Инкорпорация молекулы нуклеиновой кислоты, например, путем трансформации может осуществляться с помощью методик, в основном известных специалисту в данной области техники. Например, молекула нуклеиновой кислоты может быть инкорпорирована в растительные клетки путем инфицирования растительной ткани или растительной клетки *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащей переносу в ее плазмиду, которая может быть интегрирована в геном растения. Другим вариантом является инкорпорация путем биолистического метода переноса, при котором подлежащая инкорпорации в растительную клетку нуклеиновая кислота наносится на частицы золота или вольфрама, которые затем "выстреливаются" с большой скоростью в клетки. Еще одним вариантом инкорпорации нуклеиновой кислоты в растительную клетку, известным специалисту в данной области техники, является трансформация протопласта, при которой в протопласты в присутствии подлежащих инкорпорации молекул нуклеиновой кислоты добавляется полиэтиленгликоль, либо протопласты подвергаются воздействию коротких импульсов электрического тока, в результате чего мембрана протопласта становится транзистентно проницаемой для молекул нуклеиновой кислоты. Специалисту в

данной области техники также известны способы регенерации целых растений из трансформированных тканей или клеток.

Предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, рекомбинантный ген согласно второму аспекту и/или вектор или мобильный генетический элемент согласно третьему аспекту были стабильно инкорпорированы в геном клеток растений. Это означает, что после регенерации растения трансформированная последовательность нуклеиновой кислоты может стабильно переходить из этого растения в растение-потомок.

Предпочтительно, чтобы трансформация и регенерация сахарной свеклы осуществлялись способом, описанным Lindsey (Lindsey R. (1991) "Регенерация и трансформация сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium tumefaciens*" Plant Tissue Culture Manual B7: 1-13, Kluwer Academic Publishers).

Трансгенез растений может быть проверен посредством полимеразной цепной реакции с использованием подходящих олигонуклеотидных праймеров. После регенерации трансформанты можно выращивать в теплице с системой автоматического питания для получения семян.

Согласно варианту осуществления изобретения подлежащие трансформации растительные клетки представляют собой клетки однодольных растений. Согласно другому варианту осуществления изобретения подлежащие трансформации растительные клетки представляют собой клетки двудольных растений. Согласно еще одному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения подлежащие трансформации растительные клетки представляют собой клетки растения, выбираемого из группы, включающей виды или родительские рода *Beta vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Arenga saccharifera*, *Acer saccharum* и *Sorghum* sp.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способам повышения концентрации сахаразы в запасующем сахарозу органе растения путем экспрессии или сверхэкспрессии белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в частности, белка тонопласта, функционирующего как протон/сахарозный антипортер, по меньшей мере в одной клетке растения. Экспрессия или сверхэкспрессия достигается путем генетической модификации по меньшей мере одной клетки растения, которая включает:

(1) инкорпорацию молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту, рекомбинантного гена согласно второму аспекту и/или вектора или мобильного генетического элемента согласно третьему аспекту по меньшей мере в одну клетку растения, вызывая тем самым дополнительную экспрессию или сверхэкспрессию белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, или

(2) генетическую модификацию эндогенного регуляторного элемента, такого как промотор, который регулирует экспрессию эндогенного гена, кодирующего белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, например, путем инсерции дополнительных нис-элементов или энхансеров, вызывая тем самым повышенную экспрессию регулируемого белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер.

Экспрессия или сверхэкспрессия белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в частности белка тонопласта, функционирующего как протон/сахарозный антипортер, по меньшей мере в одной клетке растения улучшает импорт сахарозы в вакуоли генетически модифицированных клеток. Это также способствует повышению концентрации сахарозы в вакуолях этих клеток в отличие от изогенных растительных клеток.

"Повышение концентрации сахарозы" или "повышенная концентрация сахарозы" или "более высокая концентрация сахарозы в запасующем сахарозу органе растения" означает увеличение средней концентрации сахарозы, рассчитываемой по сырому весу запасующего сахарозу органа, по сравнению с не-трансгенным (изогенным) контрольным растением, выращиваемым в одинаковых условиях, по меньшей мере на 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 или 1%, предпочтительно по меньшей мере на 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 или 2%, более предпочтительно по меньшей мере на 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8 или 10% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 15%.

Для целей настоящего изобретения "сверхэкспрессированный" означает, что количество белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в растении, растительной клетке или их тонопластах превышает количество белка в изогенном растении, изогенной растительной клетке или их тонопластах.

Согласно варианту осуществления изобретения способ повышения концентрации сахарозы в запасующем сахарозу органе растения включает экспрессию и/или сверхэкспрессию нуклеотидной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, согласно первому аспекту изобретения.

С этой целью описанным выше способом создают трансгенное растение, в котором экспрессию и/или сверхэкспрессию белка(ов), функционирующего как протон/сахар-антипортер, можно улучшить с помощью различных генетических модификаций.

Например, в подлежащую трансформации растительную клетку можно инкорпорировать конструкцию, состоящую из сильного промотора и нуклеотидной последовательности согласно первому аспекту изобретения. Альтернативно, эндогенный промотор гена, кодирующего белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, в частности, гена, кодирующего белок тонопласта, функциони-

рующий как протон/сахарозный антипортер, можно модифицировать таким образом, что его активность в трансгенном растении будет выше по сравнению с изогенным контрольным растением. Например, модификация эндогенного промотора может быть осуществлена с помощью нуклеаз TALEN или "цинковые пальцы". Согласно еще одному альтернативному решению в растительную клетку могут быть инкорпорированы дополнительные копии эндогенного гена, кодирующего белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, в частности, эндогенного гена, кодирующего белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер, включая его природный промотор.

Согласно альтернативному и/или дополнительному варианту осуществления изобретения белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер, выбирают из группы, включающей белки BvTST2.1, их гомологи, аналоги и ортологи.

Согласно еще одному аспекту изобретения относится к способам идентификации растения, подходящего для генерирования повышенной концентрации сахарозы в его запасающем сахарозу органе.

Согласно варианту осуществления изобретения идентификация растений может проводиться с помощью маркеров. Для этого из каждого исследуемого растения выделяют ДНК, и выделенную ДНК подвергают либо полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием подходящих олигонуклеотидных праймеров, чтобы на основании анализа продуктов ПЦР идентифицировать растения, которые вследствие своего генетического строения подходят для генерирования повышенной концентрации сахарозы в своих запасающих сахарозу органах, либо гель-хроматографии, либо проводят флуоресцентную детекцию как при ПЦР в реальном времени. Согласно дополнительному и/или альтернативному варианту осуществления изобретения генетическое строение подлежащего идентификации растения может определяться посредством анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, при котором изолированную ДНК гидролизуют различными рестрикционными эндонуклеазами, рестрикционные фрагменты разделяют с помощью гель-хроматографии, получают реплику путем промокания и гибридизуют с подходящим зондом. Подходящие олигонуклеотиды для идентификации трансгенных растений, подходящих для генерирования повышенной концентрации сахарозы в их запасающем сахарозу органе, потому что в них экспрессируется или сверхэкспрессируется нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 2, можно выбирать из группы нуклеотидов, содержащих SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 26. Специалисту в данной области техники также, как обеспечить подходящие олигонуклеотиды для гомологов, аналогов и ортологов SEQ ID NO: 2.

Согласно дополнительному и/или альтернативному варианту осуществления изобретения идентификацию растений, подходящих для генерирования повышенной концентрации сахарозы в их запасающем сахарозу органе, осуществляют не на основании их генетического строения, а посредством экспрессии их белков тонопласта, функционирующих как протон/сахарозные антипортеры. Об этом можно судить, например, по уровню мРНК посредством определения количества мРНК в последовательностях дезоксирибо-нуклеотидов, кодирующих белки тонопласта, функционирующие как протон/сахар-антипортеры, в частности, в последовательностях дезоксирибонуклеотидов, кодирующих белки тонопласта, функционирующие как протон/сахарозные антипортеры, например, посредством "количественной ПЦР в режиме реального времени". Определение повышенного количества мРНК, кодирующей по меньшей мере один описанный выше белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, в растении, растительной ткани или растительной клетке, в частности, в ткани или клетке запасающего сахарозу органа растения по сравнению с растением того же вида или его частью, либо по сравнению с другой растительной тканью или растительной клеткой того же растения, не являющейся запасающим сахарозу органом растения, считается доказательством того, что растение подходит для генерирования повышенной концентрации сахарозы в его запасающем сахарозу органе.

Идентификацию растений, подходящих для генерирования повышенной концентрации сахарозы в их запасающем сахарозу органе, можно также осуществлять посредством количественного определения содержания белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в частности белка тонопласта, функционирующего как протон/сахарозный антипортер, в растительной части. Для этого применяется метод Вестерн-блоттинга, при котором электрофоретически выделенные белки растительной части, предпочтительно вакуолей, более предпочтительно вакуолярной мембраны этой части, инкубируют с антителом, специфичным к одному или нескольким белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахар-антипортеры, которые описаны выше. Посредством вторичного антитела, которое связывается с антителом, специфичным к одному или нескольким описанным выше белкам тонопласта, функционирующим как протон/сахар-антипортеры, используя детектирующую метку, можно определить количество белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в частности белка, функционирующего как протон/сахарозный антипортер, в частях растений или идентифицировать те растения, которые подходят для генерирования повышенной концентрации сахарозы в их запасающем сахарозу органе. Определение повышенного содержания по меньшей мере одного белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в растении, части растения или растительной клетке, в частности в ткани или клетке запасающего сахарозу органа растения по сравнению с растением того же вида или его частью, либо по сравнению с другой растительной тканью или растительной клеткой того же растения, не являющейся частью сахароза запасающего органа растения, считается доказательством того,

что растение подходит для генерирования повышенной концентрации сахарозы в его запасающем сахарозу органе.

Таким образом, настоящее изобретение также охватывает идентифицированные вышеупомянутым способом растения, подходящие для генерирования повышенной концентрации сахарозы в их запасающем сахарозу органе. Согласно еще одному аспекту изобретение относится к олигонуклеотидам, подходящим для использования в качестве молекулярных маркеров диагностической системы для детекции молекулы нуклеиновой кислоты согласно первому аспекту.

Согласно варианту осуществления изобретения по меньшей мере один подходящий олигонуклеотид выбирают из группы, включающей олигонуклеотиды согласно SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26. Они могут использоваться в качестве молекулярных маркеров диагностической системы для детекции молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к антителам, позволяющим диагностировать белок, функционирующий как протон/сахар-антипортер, предпочтительно белок, функционирующий как протон/сахарозный антипортер.

Согласно варианту осуществления изобретения антитело для диагностики представляет собой моноклональное антитело. Согласно альтернативному варианту осуществления изобретения антитело для диагностики является частью поликлональной антисыворотки.

Согласно дополнительному и/или альтернативному варианту осуществления изобретения антитело для диагностики или поликлональная антисыворотка являются специфичными к определенному белку тонопласта, функционирующему как протон/сахар-антипортер, такому как белок тонопласта, функционирующий как протон/сахарозный антипортер. Предпочтительно антитело для диагностики распознает и связывается с эпитопом в петле между шестым и седьмым трансмембранным доменом белка, функционирующего как протон/сахарозный антипортер.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к использованию белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения.

Согласно варианту осуществления изобретения использование белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения включает повышение концентрации сахарозы посредством экспрессии или сверхэкспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, функционирующий как протон/сахар-антипортер. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит

i) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14, либо нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14;

ii) молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей согласно i);

iii) молекулу нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с одной из молекул нуклеиновой кислоты согласно i) или ii); или

iv) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13, либо кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 или 13.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2 кодирует TST2.1-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Beta vulgaris*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 4 кодирует TST1-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Beta vulgaris*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 6 кодирует TST2.2-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Beta vulgaris*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8 кодирует TST3-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Beta vulgaris*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 10 кодирует TMT1-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Arabidopsis thaliana*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 12 кодирует TMT2-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Arabidopsis thaliana*, имеющий аминокислотную последо-

вательность SEQ ID NO: 11.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 14 кодирует TMT3-белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, из *Arabidopsis thaliana*, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Экспрессия и/или сверхэкспрессия по меньшей мере одной из нуклеотидных последовательностей, упомянутых в i)-iv), после ее инкорпорирования по меньшей мере в одну клетку растения, позволяет увеличить количество белка, функционирующего как протон/сахар-антипортер, в вакуоли этого растения, в частности в мембранах вакуолей запасających сахарозу органов этого растения таким образом, что в вакуоли растения может транспортироваться больше сахарозы, чем достигается повышение концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения по сравнению с изогенным контрольным растением, выращиваемым в сходных условиях. Это позволяет увеличить выход сахарозы из расчета на одно растение, один запасающий сахарозу орган и/или на 1 акр площади.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется примерами вариантов его осуществления. Примеры вариантов осуществления настоящего изобретения приводятся только с целью его иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем. Настоящее изобретение определяется только формулой изобретения.

Примеры вариантов осуществления настоящего изобретения четко показывают, что TST2.1 из *Beta vulgaris* является белком тонопласта, построенным по типу мембраны, способным высоко специфически импортировать сахарозу в вакуоль растительной клетки, функционирующей как протон/сахар-антипортер.

Пример 1. Растительный материал и условия произрастания

В следующих исследованиях использовали сорта сахарной свеклы "Belladonna RWS" и "Brigadier". Семена сорта "Belladonna RWS" были предоставлены KWS Saat AG, Айнбек, Германия, а семена сорта "Brigadier" были приобретены в местных семеноводческих хозяйствах.

Помимо этого, использовали растения и растительные клетки *Nicotiana benthamiana* и *Arabidopsis thaliana*. Растения выращивали в ростовых камерах на стандартном субстрате ED 73 компании Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG с циклом освещения 10 ч день и 14 ч ночь, при температуре 22°C и интенсивности освещения 125 мкмоль квантов/(м²с-1).

Arabidopsis Attst1-2 Т-ДНК двойной нокаут-мутант описан в предшествующем уровне техники (Wormit, A. И соавт. (2006) "Молекулярная идентификация и физиологическая характеристика нового транспортера моносахаридов из *Arabidopsis*, участвующего в вакуолярном транспорте сахаров" *Plant Cell* 18, 3476-3490). Для выращивания и исследований с 2-дезоксиглюкозой стерилизованные с поверхности семена *Arabidopsis* высевали в чашках с использованием полуконцентрированной агаризованной среды Мурасиге-Скуга (¹/₂MS), как описано в (Reiser, J. и соавт. (2004) "Молекулярно-физиологический анализ двух пластидных АТФ/АДР-транспортеров из *Arabidopsis*", *Plant Physiol.* 136: 3524-3536). Отбор растений, сверхэкспрессирующих pUBQ:BvTST2.1-GFP и 35S:BvTST1, осуществляли в чашках с агаризованной средой ¹/₂MS, содержащей 50 мкг/мл гигромицина или 40 мкг/мл канамицина.

Пример 2. Количественное определение содержания сахаров в тканях сахарной свеклы

Ткань стержневого корня сахарной свеклы получали с помощью овощерезки, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили до количественного определения уровня глюкозы при -80°C. Для определения содержания сахаров растительную ткань измельчали в жидком азоте и 50 мкг измельченной ткани дважды экстрагировали 80%-ным этанолом при 80°C в течение 20 мин. Супернатанты объединяли и упаривали на SpeedVac (Eppendorf, Гамбург, Германия). Высушенные сахара растворяли в воде и количественное содержание Сахаров определяли посредством NADP-сопряженного ферментативного анализа с использованием автоматического фотометра для микропланшет, как описано в (Bergmeyer, H.U. и Bernt, E. (1974) "Методы ферментативного анализа", т. 3, Bergmeyer, H.U. ed., Verlag Chemie New York, S. 1176-117, Lee, Y.C. (1972) "α-Маннозидаза, β-глюкозидаза и β-галактозидаза из эмульсии семян сладкого миндаля" *Methods Enzymol.* 28: 699-702).

Пример 3. Анализ экспрессии генов

Относительное накопление мРНК осуществляли методом Нозерн-блоттинга, как описано в (Young, B. и соавт. (2011) "Нуклеозид гидролазы *Arabidopsis*, участвующие в межклеточной и внеклеточной деградации пуринов" *Plant J.* 65: 703-711). Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили, как ранее описано (Leroch M. И соавт. (2005) "Идентификация и характеристика нового пластидного аденин-нуклеотидного унипортера из *Solarium tuberosum*" *J. Biol. Chem.* 280: 17992-18000). Ген-специфичные праймеры, которые были использованы, приведены табл. 1.

Таблица 1. Ген-специфичные праймеры для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих BvTST1 и BvTST2.1, и количественной ПЦР для анализа экспрессии четырех паралогичных TST-генов *Beta vulgaris*

Название	Нуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
BvTST1 GWfw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTAATGAAGGGTGCTGTGCTT	15
BvTST1GW rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTACTCCGCCTTAGCGGCTTC	16
BvTST2.1fw_XhoI	CTCGAGATGAGTGCAGCAGTATTAG	17
BvTST2.1frev_XbaI	TCTAGAGTGGCTTGCTTGTCTTGCACC	18
qPCRfwTST1	GCTGTTGCTATGAGGCTCATGGA	19
qPCRrevTST1	CCTTAGCGGCTTCTAACTGTTTAGG	20
qPCRfwTST2.1	AAAGATGAACACCACTGTGTATG	21
qPCRrevTST2.1	GTCATCAGTGGCTTGCTTGTCTTCTTG	22
qPCRfwTST2.2	AAAGATGAGCACTACTGTGCACG	23
qPCRrevTST2.2	TCAGTTGTCCTTGTCTTCAGAAGG	24
qPCRfwTST3	TCTACTTCTGCTGGTTTGTTCATGG	25
qPCRrevTST3	TCAGCTTCAGCTTGCCTTGCAC	26
Bvef1a_fw	CCACATTGCTGTCAAGTTTGCTG	27
Bvef1a_rev	TGGTAACCTTGGCACCGGTTG	28

Пример 4. Выделение вакуолей и вакуолярных мембран из ткани стержневого корня

Вакуоли выделяли по модифицированной методике Лея и Брайтона (Leigh R.A. и Branton D. (1976) "Выделение вакуолей из запасающей ткани корня *Beta vulgaris*" L. Plant Physiol 58: 656-662). С помощью специального нарезающего аппарата ткань стержневого корня нарезают ломтиками размером 0,1-0,2 мм по толщине и немедленно инкубировали в среде выделения (1 М сорбитола, 1 мМ DTT, 5 мМ EDTA, 50 мМ трис-HCl, pH 7,6) при комнатной температуре. Затем ломтики ткани стержневого корня тонко измельчали с помощью бритвенного лезвия в среде выделения (1М сорбитола, 1 мМ DTT, 5 мМ EDTA, 50 мМ трис-HCl, pH 7,6), фильтровали через сито из нержавеющей стали (100 меш) и осаждали путем центрифугирования (2000× г, 20 мин, 4°C). Осадок ресуспендировали в среде выделения с 30% Necodenz (Axis-Shield GmbH, Гейдельберг, Германия), и переносили в центрифужную пробирку на 17 мл (Beckman UltraClear). При последующем центрифугировании в роторе с качающимися бакетами (1500× г, 15 мин, 8°C) Nycodenz создает градиент плотности, а вакуоли плавают в верхней фазе градиента плотности. Вакуолярные мембраны выделяли как описано в предыдущем уровне техники (Schulze W.X. и соавт. (2012) "Холодовая акклимация вызывает изменения в содержании и активности белка тонопласта *Arabidopsis* и изменяет фосфорилирование транспортеров моносахаридов через тонопласт", Plant J. 69: 529-541). Активность α -маннозидазы в вакуолях, подвергнутых действию ультразвука, определяли как описано ранее (Boiler, T. и Kende, H. (1979) "Гидролитические ферменты центральной вакуоли растительных клеток" Plant Physiol 63: 1123-1132; Lee, Y.C. (1972) " α -Маннозидаза, β -глюкозидаза и β -галактозидаза из эмульсии семян сладкого миндаля" Methods Enzymol. 28: 699-702).

Пример 5. Жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия

Осадки выделенных вакуолярных мембран 2- или 5-месячных растений помещали в буфер (4% SDS, 50 мМ NH_4HCO_3) в концентрации 1 мкг/мл. Отобранные белки осаждали в течение ночи 80%-ным ацетоном при -20°C и затем процессировали как описано Muhlhaus (Muhlhaus T. и соавт. (2011) "Количественная панорамная протеомика с использованием унифицированного ^{15}N -меченого стандарта для мониторинга динамики протеомов в ходе времяпролетных исследований открывает новые возможности в изучении ответа на тепловой стресс *Chlamydomonas reinhardtii*", Mol. Cell. Proteomics 10: M110004739). Экстрагированные пептиды ресуспендировали в 200 мл буфера (2% ацетонитрил, 0,4% уксусная кислота).

Пробы экстрагированных пептидов - каждая объемом 3 мкл - подвергали анализу с помощью жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS анализу). Хроматографическое разделение проводили с помощью системы nanoAcquity UPLC (Waters, Эшборн, Германия) на предколонке Symmetry C18 (размер частиц - 5 мкм, размер предколонки - 180 мкм×20 мм) и на колонке BEH 130 C18 (размер частиц - 1,7 мкм, размер колонки - 75 мкм×150 мм). Элюент представлял собой двойной градиент, сначала от 100% буфера А (0,4% уксусная кислота, 1% 2-пропанол, 2% ацетонитрил) до 40% буфера В (0,4% уксусная кислота, 1% 2-пропанол, 90% ацетонитрил) в течение 2-3 ч, затем до 90% буфера В в течение более 5 мин и наконец с 90% буфером В в течение 15 мин. По окончании колонку уравнивали 100% буфером А в течение 15 мин. Гибридный масс-спектрометр LTQ XL-Orbitrap (ThermoScientific, Гамбург, Германия) работал в режиме интеллектуального сканирования с циклом полного сканирования масс-спектра в диапазоне m/z 300-1500 (Orbitrap) с заданным разрешением 60000 при m/z 400, с последующим семикратным сканированием (LTQ) наиболее интенсивных ионов в режиме интеллектуального MS/MS анализа. Однозарядные ионы исключали из MS/MS анализа, а родительские ионы для MS/MS анализа добавляли во временный лист исключений на 20 с. Каждую пробу анализировали в трех повторах.

Белки идентифицировали с помощью программного обеспечения MaxQuant и поисковой системы Adromeda (Cox J. и Mann M. (2008) "MaxQuant обеспечивает высокий уровень идентификации пептидов, великолепную точность измерения масс в диапазоне ppb и определение количественного содержания белков в протеоме" Nat. Biotechnol. 26: 1367-72) базы данных белков сахарной свеклы, созданной дома одним из изобретателей.

Пример 6. Конструкции нуклеиновой кислоты

Комплементарную ДНК (кДНК) *Beta vulgaris* приготавливали путем обратной транскрипции РНК, выделенной из стержневых корней или листьев. Все полимеразные цепные реакции проводили с использованием Phusion HF ДНК-полимеразы.

Гибридную конструкцию pUBQ:BvTST1-GFP конструировали с использованием вектора pUBC-GFP-Dest (Grefen и соавт. (2010) "Убиквитин-10 вектор на основе промотора, настроенный на маркировку флуоресцентных белков, облегчает временную стабильность и распределение нативных белков в исследованиях транзиторной и стабильной экспрессии", Plant J. 64: 355-365). Для этого кДНК BvTST1 амплифицировали и стоп-кодон удаляли посредством ПЦР, используя BvTST1 праймеры, содержащие attB1 и attB2 сайты. Продукт амплификации клонировали посредством реакции BP в pDONRZEO (Invitrogen, Гейдельберг, Германия) с последующей реакцией LR в pUBC-GFP-Dest.

Конструкцию pUBQ:BvTST2.1-GFP приготавливали следующим образом. Целую открытую рамку считывания гена BvTST2.1 амплифицировали праймерами BvTST2.1fw_XhoI/BvTST2.1rev_XbaI. Полученный ПЦР-продукт расщепляли с использованием XhoI и XbaI и лигировали в pUBC-cGFP-Dest вектор, открытый с XhoI и SpeI (Grefen и соавт. (2010)). Полученная таким образом конструкция содержит ген bar, который в трансформированных растениях приводит к устойчивости к гербициду Баста. Затем полную нуклеотидную последовательность, кодирующую BvTST2.1-GFP, вырезали из этой конструкции с использованием XhoI/PstI и вставляли в вектор pUBN-nYFP-Dest, соответствующим образом открытый с XhoI и PstI, который опосредует устойчивость к гиромизину у трансформированных растений. Расщепление pUBN-nYFP-Dest с использованием XhoI/PstI приводило к полному удалению последовательности nYFP и Gateway свойств целевого вектора, что обеспечивало его пригодность для трансформации двойных нокаут-мутантов Attst-2 посредством агробактерий (Clough S.J., Bent A.F. (1998) "Метод погружения цветочных почек: упрощенный способ Agrobacterium-опосредованной трансформации Arabidopsis thaliana" Plant J. 16: 735-743). Нуклеотидные последовательности всех генных конструкций проверяли с помощью сиквенс-анализа.

Пример 7. Исследования вакуолей трансформированных растений *Nicotiana benthamiana* методом локальной фиксации потенциала

Для транзиторной сверхэкспрессии транспортных белков для сахаров (BvTST1-GFP и BvTST2.1), меченых зеленым флуоресцентным белком (GFP) с С-конца, или только с GFP под контролем убиквитинового промотора (pUBQ10) в мезофильных клетках *N. benthamiana* N. использовали метод агроинфильтрации 5-7-недельных растений Latz и соавт. (2007) (Latz и соавт. (2007) "В полевых условиях АКТ2 субъединицы представляют собой pH и Ca²⁺-чувствительный K⁺ канал внутреннего выпрямления" Planta, 225: 1179-1191). В отличие от метода, известного из предыдущего уровня техники, штамм GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* использовали в качестве переносчика для нуклеотидной последовательности, кодирующей ген 19K, и для соответствующих белок/GFP конструкций транспорта сахаров. Бактерии культивировали в течение ночи в 5 мл среды YEB, центрифугировали при 8000× г в течение 1 мин при комнатной температуре и дважды промывали Agromix (Latz и соавт. (2007)). Бактериальные клетки ресуспендировали в 3 мл Agromix и выдерживали в темноте в течение 2-3 ч при 28°C. Для инфильтрации 1 мл суспензии Agrobacteria, содержащей 19K, смешивали с 1 мл суспензии Agrobacteria, содержащей pUBQ:BvTST1-GFP, pUBQ:BvTST2.1-GFP или pUBQ:GFP, и добавляли 2 мл Agromix.

Через два дня после агроинфильтрации протопласты мезофильных клеток выделяли, как описано Beyhl и соавт. (Beyhl D. и соавт. (2009) "Мутации фу2 в главном вакуолярном катионном канале TPC1 придают устойчивость к ингибиторному эффекту люминального кальция", Plant J. 58: 715-723). После инкубации листовых пластинок в ферментном растворе в течение 1 ч выделившиеся протопласты промывали 500 mM сорбитола и 1 mM CaCl₂. Вакуоли высвобождали непосредственно в камерах для локальной фиксации потенциала из протопластов с использованием лизисного буфера с осмотической концентрацией 280 мОсмороль×кг⁻¹ (10 mM EGTA, 10 mM Хепес/Трис, pH 7,4; осмотическая активность, определяемая D-сорбитолом). Макроскопические токи измеряли в конфигурации "вся вакуоль" (Beyhl D. и соавт. (2009) "Мутации фу2 в главном вакуолярном катионном канале TPC1 придают устойчивость к ингибиторному эффекту люминального кальция", Plant J. 58: 715-723) и пропускали через фильтр нижних частот с частотой среза 100 Гц. Состав растворов камеры и пипетки был идентичным (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 450-500 Осмороль×кг⁻¹, определяемый D-сорбитолом), за исключением pH. pH раствора камеры составлял 7,4 (Хепес/Трис), pH раствора пипетки - 5,5 (Мес/Трис). Для измерения потока протонов, индуцируемого сахарами, на плазматической стороне вакуолярной мембраны добавляли глюкозу и сахарозу в конечной концентрации 50 mM каждой.

Пример 8. Анализ протеома мембраны вакуолей клеток стержневого корня сахарной свеклы

Для анализа протеома вакуолярной мембраны клеток стержневого корня сахарной свеклы выделяли вакуоли клеток стержневых корней 5-месячных растений свеклы (*Beta vulgaris*) сорта "Belladonna KWS" и вакуолярную мембрану обогащали посредством высокоскоростного центрифугирования. Гидрофобные мембранные белки осаждали ацетоном из отмытой несколько раз фракции тонопласта, затем ресуспендировали в растворе мочевины (8 М мочевины) и до LC-MS/MS анализа подвергали расщеплению трипсином.

В каждом из обогащенных препаратов тонопласта было идентифицировано в общей сложности около 400 различных белков. Один из этих белков, в дальнейшем называемый BvTST2.1 (SEQ ID NO: 1), присутствовал в больших количествах во всех препаратах независимо от их приготовления, имел сигнатуру транспортера сахара ([LIVMSTAG]-[LIVMFSAG]-(SH)-(RDE)-[LIVMSA]-[DE]-(TD)-[LIVMFYWA]-G-R-[RK]-[(4,6)-[GSTA]; запись базы данных Prosite PS00216, <http://prosite.expasy.org/>) и обладал самым высоким сходством с вакуолярным транспортером моносахаридов TMT2 из *Arabidopsis thaliana* (фиг. 1).

Пример 9. Ген белков-транспортеров сахаров через тонопласт в геноме сахарной свеклы

При исследовании генома *B. Vulgaris* были идентифицированы 4 паралогичных гена, которые кодируют белки-транспортеры сахаров через тонопласт. Филогенетический анализ (фиг. 2) показал, что транспортеры сахаров BvTST1 и BvTST3 самым тесным образом связаны с ортологичными генами AtTMT1 или AtTMT3 *Arabidopsis*, а последовательности очень сходной пары генов BvTST2.1 и BvTST2.2 обладают самым большим сходством с последовательностью ортолога AtTMT2 *Arabidopsis* (фиг. 1). Сходство аминокислотной последовательности BvTST2.1 с последовательностью AtTMT2 составляет около 68%, а идентичность - 84% (фиг. 1).

Пример 10. Межклеточная локализация BvTST2.1

Межклеточную локализацию BvTST2.1 исследовали у двойных нокаут-мутантов AtTST1-2, стабильно трансформированных конструкцией pUBQ:BvTST2.1-GFP.

Выделение протопластов из мезофильных клеток листьев и высвобождение вакуолей осуществляли по известной методике (Yoo S.D. и соавт. (2007) "Мезофильные протопласты *Arabidopsis*: неустойчивая система клеток для анализа транзientной экспрессии генов", Nat. Protocol 1565-1572).

Для получения флуоресцентных микроскопных изображений использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Вецлар, Германия). Все изображения получали с помощью линз Leica HCX PL APO 63×/1,2w motCORR CS. Обработку изображений проводили с использованием программного обеспечения Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite.

После клонирования целой мРНК BvTST2.1 межклеточную локализацию белка определяли по стабильной экспрессии гибридного белка BvTST2.1-GFP у *Arabidopsis*. Зеленый флуоресцентный белок, который наблюдался в мезофильных клетках листьев мутантов *Arabidopsis* стабильно экспрессирующим BvTST2.1-GFP, указывал на то, что гибридный белок был локализован в вакуолях, тесно окружающих хлоропласты.

В результате ферментативного расщепления мезофильной ткани BvTST2.1-GFP-экспрессирующих растений были получены отдельные интактные протопласты. Последующая гипоосмотическая обработка этих протопластов приводила к высвобождению вакуолей, стабильно экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, посредством которых подтверждали локализацию BvTST2.1-GFP в тонопласте.

Пример 11. Корреляция экспрессии BvTST2.1 и концентрации сахарозы в стержневых корнях сахарной свеклы

Для обнаружения возможной корреляции между экспрессией BvTST2.1 в стержневых корнях сахарной свеклы и концентрацией сахарозы в сахарной свекле определяли экспрессию гена BvTST2.1 в сортах "Belladonna KWS" и "Brigadier" сахарной свеклы.

Сорт "Belladonna KWS" известен как сорт сахарной свеклы, отличающийся высокой концентрацией сахарозы. Уже через два месяца после посадки концентрация сахарозы в его стержневых корнях достигала порядка 160 мкмоль/г сырого веса (фиг. 3). Эта высокая концентрация сахарозы еще больше возрастала за последующие три месяца развития, достигая 450 мкмоль/г, т.е. увеличивалась в 3 раза по сравнению с 2-месячными корнеплодами.

В отличие от этого сорта содержание сахарозы в стержневых корнях сорта "Brigadier" за два месяца выращивания составило менее 70 мкмоль сырого веса, а за последующие три месяца достигло только около 195 мкмоль/г сырого веса (фиг. 3).

Сравнение концентрации сахарозы в листьях и стержневых корнях показало, что содержание сахарозы в стержневых корнях было почти в 30 раз выше, чем в листьях, в то время как концентрация глюкозы в листьях превышала концентрацию глюкозы в стержневых корнях в 80 раз.

Различия в накоплении сахарозы разными сортами сахарной свеклы также отмечались в количестве мРНК, кодирующей BvTST2.1 (фиг. 4). Как в стержневых корнях сорта "Belladonna KWS", так и в стержневых корнях сорта "Brigadier" количества мРНК во всех четырех паралогичных транспортерах сахаров были низкими после двух месяцев выращивания.

После еще одного месяца выращивания и развития количество мРНК BvTST2.1 у этих двух сортов значительно повысилось по сравнению с количествами мРНК, кодирующими BvTMT1, BvTMT2.2 и

BvTMT3. Более того, количество мРНК BvTST2.1 в стержневых корнях сорта "Belladonna KWS" было в 2,6 раза выше, чем в стержневых корнях сорта "Brigadier" (фиг. 4).

Спустя еще два месяца выращивания количество мРНК BvTST2.1 у обоих сортов существенно не изменилось по сравнению с количеством после 3 месяцев выращивания. Даже после пяти месяцев выращивания и развития количество мРНК BvTST2.1 в стержневых корнях сорта "Belladonna KWS" было все еще в 2,6 раза выше, чем в стержневых корнях сорта "Brigadier".

Чтобы получить больше информации, подтверждающей важность белка BvTST2.1 для запасаания сахарозы, определяли концентрации глюкозы, фруктозы и сахарозы в листьях трех- и пятимесячных растений сорта "Belladonna KWS" (фиг. 5) и сравнивали с количествами мРНК четырех TST-паралогов (фиг. 6). В отличие от стержневых корней, где содержание глюкозы и фруктозы было очень низким, эти два моносахарида накапливались в листьях. В листьях трехмесячных растений сахарной свеклы концентрация глюкозы и фруктозы составила 33-35 мкмоль/г сырого веса, в то время как концентрация сахарозы достигала менее 15 мкмоль/г сырого веса. После пяти месяцев выращивания концентрация каждого из этих трех сахаров составляла 6-9 мкмоль/г сырого веса (фиг. 5).

Важно отметить, что количество мРНК BvTST2.1 в листьях было постоянно ниже, чем количество мРНК BvTMT1, BvTMT2.2 и BvTMT3, в то время как количество мРНК BvTST2.1 в стержневых корнях было всегда выше, чем количество мРНК других изоформ (фиг. 6).

Пример 12. BvTST2.1-опосредованный транспорт сахарозы через тонопласт

Для демонстрации транспортной функции BvTST2.1 выделенные вакуоли исследовали с помощью метода локальной фиксации потенциала. Для этого гибридный белок BvTST2.1-GFP транзientно экспрессировали в мезофильных клетках *Nicotiana benthamiana*. Интактные вакуоли трансформированных протопластов идентифицировали по их зеленому цвету после гипоосмотического лизиса в мягких условиях.

Для реплицирования физиологического трансмембранного протонного градиента выделенных вакуолей среду в пипетке, представляющей собой люминальное содержимое вакуоли, забуферивали pH 5,5, а среду в камере (=Bad), представляющую собой цитозоль, регулировали до pH 7,5. При добавлении к цитозольной среде сахарозы вакуоли реагировали с сильным отклонением вниз течения тока. Добавление сахарозы в среду, окружающую выделенные вакуоли, приводило к течению тока в направлении вверх, что предполагает сахарозный транспорт, функционирующий по принципу антипорта с протонами.

В отсутствие BvTST2.1 выделенные вакуоли *N. Benthamiana* не проявляли значительной активности в протон/сахарозном транспорте. Наоборот, в случае BvTST2.1-содержащих вакуолей добавление сахарозы в среду камеры приводило к течению тока вверх величиной почти -1 pA/pF (фиг. 7). Эти токи представляют собой биологический фингерпринт протон-движимого импорта сахарозы через вакуолярную мембрану, содержащую BvTST2.1-GFP, и являются четким указанием на то, что BvTST2.1 объединяет экспорт протонов вдоль протонного градиента через мембрану с импортом сахарозы против существующего сахарозного градиента. Последняя функция является биохимической предпосылкой того, что сахарная свекла способна накапливать большие количества сахарозы в вакуолях своих стержневых корней.

Важно отметить, что BvTST2.1 не облегчает глюкоза-опосредованный экспорт протонов. В отличие от BvTST2.1 изоформа BvTST1 опосредует как сахароза-связанный, так и глюкоза-связанный ток величиной порядка -0,3 pA/pF (фиг. 7; табл. 2).

Таблица 2. Сахар-индуцируемые изменения плотности тока отдельных вакуолей.

Эти данные свидетельствуют о том, что BvTST1 является специфичным для сахарозы.

	Плотность тока [Δ I/Δm (pA/pF)]		Чистое соотношение, sac/glc
	Сахароза	Глюкоза	
BvTST1-GFP	-0,28 ± 0,06	-0,29 ± 0,04	0,81
BvTST2.1-GFP	-1,03 ± 0,29	-0,018 ± 0,005	∞
GFP (контроль)	-0,11 ± 0,04	-0,08 ± 0,03	

Пример 13. Специфичность сахарозы BvTST2.1 in vivo

Для анализа субстратной специфичности BvTST2.1 в живых растительных клетках двойные нокаут-мутанты AtTMT, не содержащие ни одного из двух белков-транспортёров моносахаридов, через тонопласт трансформировали конструкцией pUBQ:BvTST2.1-GFP или конструкцией pUBQ:BvTST1. Трансформанты росли в присутствии токсичного аналога глюкозы 2-дезоксиглюкозы. В контрольных исследованиях без 2-дезоксиглюкозы все растительные линии демонстрировали сходный рост. В присутствии 2-дезоксиглюкозы двойной нокаут-мутант *tst1-2* не развивался должным образом, в то время как растения и линии дикого типа, экспрессирующие BvTST1, демонстрировали намного лучший рост. Растения дикого типа и экспрессирующий двойной нокаут-мутант BvTST1 росли намного лучше в присутствии 2-дезоксиглюкозы, по-видимому, потому, что 2-дезоксиглюкоза могла транспортироваться в вакуоли для детоксикации. Двойной нокаут-мутант не способен на это. Двойные нокаут-мутанты растений, экспрес-

сирующих BvTST2.1, были не способны компенсировать задержку пролиферации двойных нокаут-мутантов AtTST1-2 в присутствии 2-дезоксиглюкозы, хотя гибридный белок BvTST2.1-GFP и присутствовал в вакуолярных мембранах.

Замечательная чувствительность AtTST1-2:: BvTST2.1-GFP растений к 2-дезоксиглюкозе *in vivo* соответствует электрофизиологическим данным и сахарозной специфичности BvTST2.1, полученной посредством выделенных вакуолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный ген, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, характеризующийся тем, что белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, является специфичным для сахарозы, при этом специфичность белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для сахарозы по меньшей мере в 5 раз выше чем для моносахарида и при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2;

б) нуклеотидную последовательность, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей согласно а);

с) нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с одной из молекул нуклеиновой кислоты согласно а) или б);

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 1; и

е) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид SEQ ID NO: 1, при этом молекула нуклеиновой кислоты оперативно связана по меньшей мере с одним регуляторным элементом и при этом нуклеотидная последовательность, кодирующая белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, и нуклеотидная последовательность по меньшей мере одного регуляторного элемента являются гетерологичными.

2. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1 или рекомбинантный ген по п.1.

3. Мобильный генетический элемент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1 или рекомбинантный ген по п.1.

4. Эукариотическая клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1 в качестве трансгена, рекомбинантный ген по п.1 в качестве трансгена, вектор по п.2 или генетический мобильный элемент по п.3.

5. Белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, кодируемый рекомбинантным геном по п.1.

6. Трансгенная растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1 в качестве трансгена, рекомбинантный ген по п.1 в качестве трансгена, вектор по п.2 или генетический мобильный элемент по п.3.

7. Трансгенное растение или его часть, содержащие трансгенные растительные клетки по п.6.

8. Семена трансгенного растения по п.7, характеризующиеся тем, что они содержат молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 в качестве трансгена, рекомбинантный ген по п.1 в качестве трансгена, вектор по п.2 или генетический мобильный элемент по п.3.

9. Способ получения трансгенного растения по п.7, включающий следующие этапы:

(а) введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1, рекомбинантного гена по п.1, вектора по п.2 или мобильного генетического элемента по п.3 по меньшей мере в одну клетку растения, и

(б) регенерацию трансгенного растения из растительной клетки, полученной на этапе (а).

10. Способ повышения концентрации сахарозы в запасающем сахарозу органе растения с помощью экспрессии или сверхэкспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1 по меньшей мере в одной клетке растения.

11. Способ идентификации растения, подходящего для генерирования повышенной концентрации сахарозы в его запасающем сахарозу органе, включающий детекцию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, по п.1, определение количества мРНК, кодирующей белок по п.5, или детекцию количества белка по п.5.

12. Олигонуклеотид для использования в качестве молекулярного маркера, способного детектировать молекулу нуклеиновой кислоты по п.1, отличающийся тем, что олигонуклеотид выбран из группы

олигонуклеотидов, состоящей из SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 26.

13. Применение белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для повышения концентрации сахарозы в запасящем сахарозу органе растения с помощью экспрессии или сверхэкспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок тонопласта, функционирующий как протон/сахар-антипортер, при этом специфичность белка тонопласта, функционирующего как протон/сахар-антипортер, для сахарозы по меньшей мере в 5 раз выше чем для моносахарида и при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит:

i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 либо нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2;

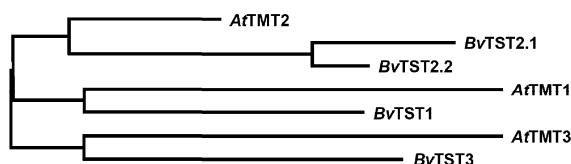
ii) нуклеотидную последовательность, которая комплементарна одной из нуклеотидных последовательностей согласно i;

iii) нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с одной из нуклеотидных последовательностей согласно i или ii; или

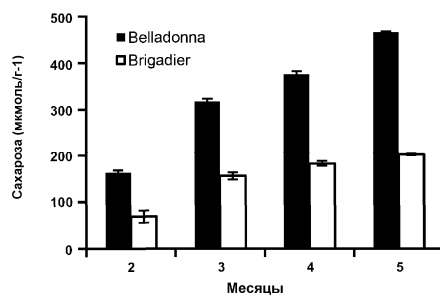
iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, либо кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого обладает по меньшей мере 80% идентичностью с одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1.

	<i>BvTST1</i>	<i>AtTMT2</i>	<i>BvTST2.1</i>	<i>BvTST2.2</i>	<i>AtTMT3</i>	<i>BvTST3</i>	
<i>AtTMT1</i>	62% 77%	61% 75%	56% 73%	57% 74%	52% 68%	58% 72%	идентичность сходство
<i>BvTST1</i>		65% 80%	58% 76%	61% 77%	57% 71%	60% 74%	идентичность сходство
<i>AtTMT2</i>			68% 84%	70% 84%	60% 75%	64% 77%	идентичность сходство
<i>BvTST2.1</i>				84% 92%	56% 73%	61% 75%	идентичность сходство
<i>BvTST2.2</i>					58% 75%	63% 76%	идентичность сходство
<i>AtTMT3</i>						60% 75%	идентичность сходство

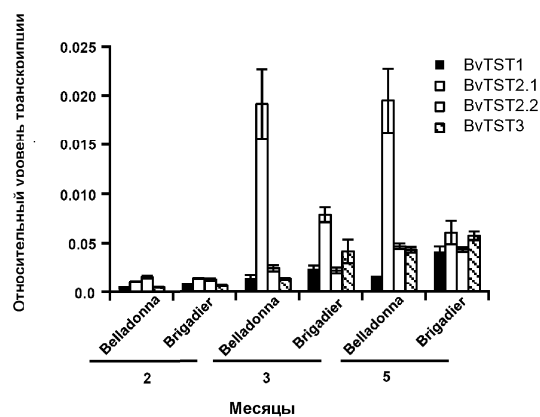
Фиг. 1



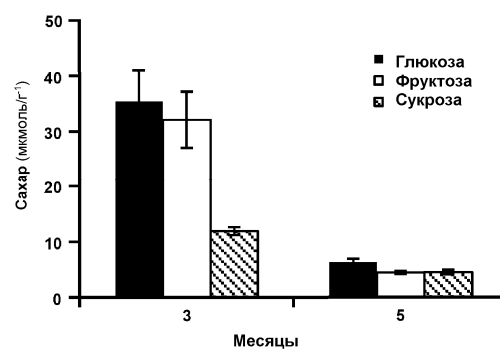
Фиг. 2



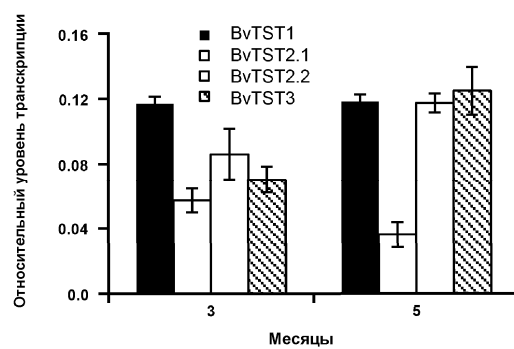
Фиг. 3



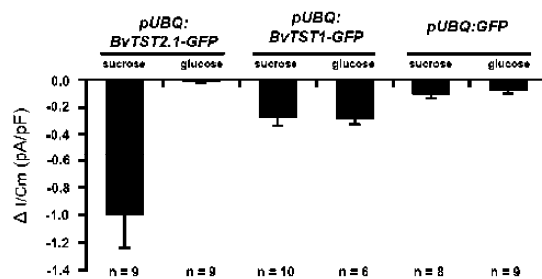
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

