



(51) МПК
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008117455/10, 02.10.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.10.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.10.2005 US 60/723,178

(43) Дата публикации заявки: **10.11.2009** Бюл. № 31

(45) Опубликовано: **10.09.2012** Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 2003/056242 A1, 20.03.2003. WO 93/19190 A1, 30.09.1993. WO 95/15392 A1, 08.06.1995. WO 2005/077117 A2, 25.08.2005. СИНГЕР М., БЕРГ П. Гены и геномы. - М.: Мир, 1998, т.2.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **04.05.2008**

(86) Заявка РСТ:
US 2006/038289 (02.10.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/041419 (12.04.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**МАЛВАР Томас М. (US),
 ХУАНГ Шихших (US),
 ЛЮТИ Михель Х. (US)**

(73) Патентообладатель(и):

МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС (US)

(54) СЕМЕНА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИЗИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Описано семя трансгенной кукурузы, содержащее более чем 4000 частей на миллион (ppm) свободного лизина, где семя кукурузы содержит нативную ДНК и одну или несколько экзогенных кассет для экспрессии в растениях, содержащих молекулу ДНК, кодирующую дигидродипиколинатсинтазу, устойчивую к ингибированию свободным L-лизином по принципу обратной связи, молекулу ДНК, транскрибируемую с

получением молекулы РНК, подавляющей лизинкетоглутаратредуктазу/сахаропиндегидрогеназу, и молекулу ДНК, кодирующую аспараткиназу, устойчивую к действию лизинопосредованной обратной связи; где молекулы ДНК функционально связаны с одной или несколькими промоторными молекулами таким образом, что происходит транскрипция одной или нескольких молекул РНК в основном в эндосперме кукурузного семени, где, необязательно, семя кукурузы содержит экзогенный ген, придающий

устойчивость к гербицидам. Представлен способ получения кукурузной муки, включающий получение указанного семени кукурузы и переработку семени с получением муки. Описана мука, полученная указанным способом. Предложено применение указанного семени для получения муки тонкого или

грубого помола, корма для животных, получения белкового концентрата или изолята и употребления указанного семени человеком или животным. Изобретение позволяет получить богатые лизином пищевые продукты, не требующие дополнительного добавления лизина. 7 н. и 4 з.п. ф-лы, 2 табл., 8 ил., 2 пр.

RU 2 4 6 0 2 8 1 C 2

RU 2 4 6 0 2 8 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008117455/10, 02.10.2006**

(24) Effective date for property rights:
02.10.2006

Priority:

(30) Convention priority:
03.10.2005 US 60/723,178

(43) Application published: **10.11.2009 Bull. 31**

(45) Date of publication: **10.09.2012 Bull. 25**

(85) Commencement of national phase: **04.05.2008**

(86) PCT application:
US 2006/038289 (02.10.2006)

(87) PCT publication:
WO 2007/041419 (12.04.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**MALVAR Tomas M. (US),
KhUANG Shikhshikh (US),
LJuTI Mikhel' Kh. (US)**

(73) Proprietor(s):

MONSANTO TEKNOLODZhi LLS (US)

(54) **SEEDS OF TRANSGENIC PLANTS WITH HIGH CONTENT OF LYSINE**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry. Seeds of transgenic corn is described containing more than 4000 parts per million (ppm) of free lysine, where seeds of corn contain native DNA and one or more exogenous cassettes for expression in plants containing a DNA molecule encoding a dihydrodipicolinatsynthase resistant to inhibition by free L-lysine by the feedback principle, the DNA molecule, transcribed to produce RNA molecule, which suppresses lysinetoglutarate reductase/ sugar pindehydrogenase, and a DNA molecule encoding aspartatkinase resistant to the action of lysine-mediated feedback, where the DNA molecules are functionally linked to one or more promoter

molecules in such a way that transcription of one or more RNA molecules occurs mainly in the endosperm of corn seed, which, optionally, the corn seed contains an exogenous gene, which confers resistance to herbicides. A method of obtaining corn flour is proposed, including obtaining of the said corn seed and seed processing to obtain flour. Flour is described obtained by this method. Use of the said seed is proposed to produce fine flour or coarse flour, animal feed, obtaining protein concentrate or isolate, and use of this seed by a human or an animal.

EFFECT: invention enables to obtain food products rich in lysine that do not require further addition of lysine.

11 cl, 2 tbl, 8 dwg, 2 ex

Испрашиваемый приоритет

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США с серийным номером 60/723178, поданной 3 октября 2005 г. и полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники1. Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем описании раскрыты ДНК-конструкции, пригодные для получения трансгенных растений с частями, имеющими повышенное содержание лизина, а также способы использования таких ДНК-конструкций для получения трансгенных растений и семян, собранных с растений материалов, а также муки и пищевых продуктов, получаемых из вышеперечисленного сырья. Такие ДНК-конструкции пригодны для получения трансгенных растений повышенной пищевой ценности, обусловленной повышением накопления лизина в семенах. Также раскрыты полинуклеотидные молекулы и способы, пригодные для получения трансгенных растений с повышенным содержанием лизина в семенах.

2. Описание уровня техники

Zea mays, обычно называемая маисом или кукурузой, представляет собой зерновую культуру, широко используемую в качестве пищи для человека и животного корма. Зерно, в настоящем описании называемое также семенами, является источником белка, крахмала и масла для многих низших животных, в том числе для свиней, мясного и молочного скота, рыбы и домашней птицы. В некоторых странах, таких как Мексика, более 70% собранной кукурузы потребляется людьми и кукуруза и получаемые из нее продукты, такие как мамалыга и плоские маисовые лепешки, являются пищевыми продуктами массового потребления. Основная часть аминокислотного состава зерна определяется количеством и типом аминокислот, содержащихся в полипептидах. Только относительно небольшая часть, до 10%, доступных аминокислот в зерне находится в виде свободных аминокислот; остальные содержатся в различных белках. Большинство полипептидов кукурузы, находящихся в зерне, являются запасными белками семян, или зеинами. Эти запасные белки семян синтезируются в ходе развития зерна и используются в качестве источника энергии в ходе прорастания и роста последнего. Однако эти запасные белки семян содержат мало лизина либо вообще не содержат этой аминокислоты. Из десяти аминокислот, которые считаются незаменимыми в смешанных зерновых кормах (аргинин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин или цистеин, фенилаланин или тирозин, треонин, триптофан и валин), не только лизин, но также треонин и метионин практически отсутствуют в кукурузном зерне. Нехватка этих незаменимых аминокислот, в особенности лизина, требует добавления этих питательных веществ к пищевому кукурузному зерну, что часто достигается путем дополнительного введения соевой муки или синтетического лизина. Увеличение содержания лизина в семенах кукурузы с целью повышения питательной ценности последних в качестве пищи или кормового зерна может быть полезным в данной области техники. Дополнительное преимущество может быть реализовано в том случае, если к зерну нужно будет добавлять лишь малые количества лизина либо не добавлять его вообще.

В отношении питания человека имеет место плохая тенденция к употреблению пищи, относительно богатой недорогими крахмалосодержащими продуктами и относительно бедной высококачественным белком. Квашиоркор (детская пеллагра) - форма нарушения питания, вызванная потреблением белков неадекватного качества при общей высокой энергетической ценности (общей калорийности) потребляемой

пищи. Ранние симптомы являются очень общими и включают усталость, раздражительность и сонливость. При продолжительном дефиците белка наблюдается отставание в росте, потеря мышечной массы, генерализованный отек (эдема) и снижение иммунитета. Обычным является вздутие живота. Часто наблюдаются

кожные проявления (такие, как дерматит, изменение пигментации, истончение волос и витилиго). Смерти предшествуют шок и кома. Согласно одной из правительственных оценок не менее 50% пожилых людей в домах престарелых США страдают от нарушения питания, связанного с низким уровнем белковой калорийности пищи.

Таким образом, продукты, полученные из кукурузы с улучшенным в силу повышенного содержания лизина качеством белкового состава, могли бы значительно улучшить не только питательную ценность пищевых продуктов, но и общий уровень здоровья.

Молекулярно-биологический подход к повышению содержания лизина включает идентификацию и введение в кукурузу генов с целью оказания воздействия на содержание лизина в зерне, не сопровождающегося отрицательным воздействием на агрономические свойства. Лизин продуцируется из аспартата, метаболизм которого, в свою очередь, взаимно связан с биохимическими путями, в которых участвуют треонин, метионин и изолейцин. Сам лизин служит конечным продуктом, модифицирующим и регулирующим ферменты, принимающие участие в его собственном биосинтезе. Ключевыми ферментами, принимающими участие в метаболизме лизина, являются аспартаткиназа (АК) и дигидродипиколинатсинтаза (DHDPS), в то время как лизинкетоглутаратредуктаза (LKR, бифункциональный фермент, также известный как сахаропиндегидрогеназа, SDH), по-видимому, играет ключевую роль в катаболизме лизина. АК и DHDPS формируют петлю обратной связи, регулируемую лизином; по мере повышения содержания лизина он подавляет активность этих ферментов.

Таким образом, для повышения содержания лизина предпочтительно оперировать с вариантами АК или DHDPS, нечувствительными к обратной связи. Были описаны нечувствительные к лизину варианты бактериального, а также растительного генов АК (см. Falco с соавторами, патент США № 5773691, включенный в настоящее описание посредством ссылки). Нечувствительные к лизину формы АК были идентифицированы в ячмене, кукурузе и табаке. Было показано, что бактериальный ген DHDPS, выделенный из *E.coli*, по меньшей мере в 20 раз менее чувствителен к повышению содержания лизина (Glassman с соавторами, патент США № 5258300; Galili с соавторами, патент США № 5367110).

В публикациях Falco с соавторами (патенты США № 5773691 и 6459019, публикация заявки на патент США № 2003/0056242) и Dizigan с соавторами (патентная публикация № 2005/0132437), каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки, описано выделение и использование нечувствительной к лизинопосредованной обратной связи аспартаткиназы (ген АК, известный как *lysC*) из *E.coli*, DHDPS из *E.coli*, а также DHDPS из *Corynebacterium* (известный и обозначаемый в настоящем описании как *CORgl.dapA*), для получения трансгенных растений - рапса, табака, кукурузы и сои с повышенным содержанием лизина в семенах.

Настоящее изобретение относится к ДНК-конструкциям, которые, будучи экспрессированными в растительных клетках, обеспечивают повышение питательной ценности растений, в частности повышенное содержание лизина в семенах растения.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к ДНК-конструкциям, которые при

функционировании в геноме трансгенного растения обеспечивают повышение содержания лизина в семени растения. Собранные семена с высоким содержанием лизина могут быть полезны для производства пищевой и кормовой продукции, такой как кукурузная мука (в том числе мука, известная как «маса харина»), кукурузная мука и мучные изделия, в которые нужно добавлять лишь небольшие количества лизина либо не нужно добавлять его вообще. Предпочтительно трансгенное растение и семя представляет собой растение и зерно сельскохозяйственных культур, предпочтительно - однодольное растение и семя и наиболее предпочтительно - семя и растение кукурузы.

Настоящее изобретение относится к содержащим ДНК-конструкции трансгенным растениям и семенам с повышенным содержанием лизина в семени. ДНК-конструкции по настоящему изобретению включают молекулу, которая, будучи экспрессированной в клетках кукурузы, ингибирует продукцию лизиндеградирующего полипептида, а также молекулу, которая, будучи экспрессированной в клетках кукурузы, обеспечивает продукцию нечувствительных к лизину полипептида дигидродипиколинатсинтазы и аспартаткиназы.

Даже в том случае, если собранное зерно является нежизнеспособным и, таким образом, не может быть использовано в качестве семян, оно тем не менее содержит повышенное содержание лизина и характеризуется повышенным качеством белка согласно настоящему изобретению. Подобное собранное зерно может быть переработано тем же образом, что и обычное зерно. Соответственно, в другом воплощении настоящее изобретение относится к корму для животных с повышенным содержанием лизина, получаемому путем выращивания трансгенного растения по настоящему изобретению и сбора семян с повышенным содержанием лизина или путем переработки по настоящему изобретению либо их части. В другом воплощении настоящее изобретение относится к муке или мучным изделиям, получаемым путем выращивания трансгенного растения по настоящему изобретению и сбора семян с повышенным содержанием лизина или путем переработки семян по настоящему изобретению либо их части.

В одном из воплощений настоящего изобретения ДНК-конструкция включает новые полинуклеотидные композиции, усовершенствованные для экспрессии в растительных клетках, особенно в клетках кукурузы. Один из новых полинуклеотидов (SEQ ID NO:5) кодирует полипептид дигидродипиколинатсинтазы, другой новый полинуклеотид (SEQ ID NO:9) является гомологичным и комплементарным части полинуклеотидной последовательности, кодирующей лизинкетоглутаратредуктазу. Экспрессия этой ДНК-конструкции в растительной клетке, особенно в клетке кукурузы, предпочтительно в клетке кукурузного семени, приводит к повышению содержания лизина в кукурузном семени. ДНК-конструкция включает полинуклеотиды, например такую последовательность, как SEQ ID NO:1, кодирующую нечувствительную к лизину дигидродипиколинатсинтазу, а также такую последовательность, как SEQ ID NO:2, кодирующую лизинкетоглутаратредуктазу и используемую в качестве матрицы для конструирования ингибиторных молекул РНК, либо такую последовательность, как SEQ ID NO:3, кодирующую аспартаткиназу. ДНК-конструкция предпочтительно содержит молекулу промотора, усовершенствованную для управления транскрипцией функционально связанного полинуклеотида в семени кукурузы. Помимо этого ДНК-конструкция может содержать новую молекулу ДНК (SEQ ID NO:10), содержащую молекулу для подавления гена, мишенью которой является ген лизинкетоглутаратредуктазы, где

молекула, подавляющая ген, помещена в интрон ДНК-конструкции.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения кукурузного семени с повышенным содержанием лизина посредством скрещивания инбредных родительских растений с последующим получением гибридных семян, при котором каждое из родительских растений содержит в своем геноме одну или несколько ДНК-конструкций, составляющих предмет настоящего изобретения, в составе кассет для экспрессии в растениях, причем в каждом из родительских растений экспрессионные кассеты различны и ни одно из родительских растений не содержит всех трех; а также последующим сбором семян, имеющих содержание лизина выше, чем в каждом из родительских растений.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения продуктов питания человека или кормовых продуктов для животных, содержащих повышенное содержание лизина, включающему стадию переработки семян или их части, полученных из трансгенных растений, геном которых содержит экзогенную ДНК-конструкцию или набор конструкций согласно настоящему изобретению. Помимо этого настоящее изобретение относится к способу получения продуктов питания человека или кормовых продуктов для животных, имеющих повышенное содержание лизина, включающему стадию выращивания трансгенного растения с последующим получением семян, геном которых содержит экзогенную ДНК-конструкцию по настоящему изобретению, с последующим сбором семян.

Краткое описание графического материала

Фиг.1. Карта плазмиды rMON66649.

Фиг.2. Карта плазмиды rMON80003.

Фиг.3. Карта плазмиды rMON79465.

Фиг.4. Карта плазмиды rMON93092.

Фиг.5. Карта плазмиды rMON93093.

Фиг.6. Карта плазмиды rMON80378.

Фиг.7. Содержание свободного лизина в зернах, полученных из объектов, содержащих rMON93092.

Фиг.8. Содержание свободного лизина в зернах, полученных из объектов, содержащих rMON93093.

Подробное описание изобретения

Трансгенное растение или семя, проявляющее желаемое свойство, например повышенное содержание лизина по изобретению, содержит специфическую экзогенную ДНК, встроенную в геном трансгенного растения и обуславливающую наличие желаемого свойства. Данное свойство может быть выражено как измеряемое изменение природного свойства контрольного растения, например растения или семени практически того же генотипа, лишённого специфической экзогенной ДНК. Предпочтительно изменение оценивается путем сопоставления количественного выражения данного свойства в трансгенном растении или семени, имеющем специфическую экзогенную ДНК, и количественного выражения того же свойства в контрольном растении или семени. Таким образом «маис с повышенным содержанием лизина» представляет собой растение кукурузы (маиса) с повышенным содержанием лизина в любой части растения, предпочтительно в семенах, которые в настоящем описании также могут быть названы зерном (в том числе и в агрегированной форме). Настоящее изобретение относится к ДНК-конструкциям и семенам, содержащим в своем геноме по крайней мере одну из ДНК-конструкций в составе кассет, экспрессии в растениях по настоящему изобретению, а также характеризующимся повышенным

содержанием лизина по сравнению с семенами, не содержащими конструкции.

Повышенное содержание лизина может проявляться растением путем накопления повышенных количеств данной аминокислоты в зерне и может быть измерено при помощи любого подходящего способа, такого как масс-спектрофотометрия или высокоэффективная жидкостная хроматография подходящим образом полученного тканевого экстракта. Трансгенное кукурузное зерно с повышенным содержанием лизина по настоящему изобретению особенно полезно в качестве пищевого продукта или корма, а также муки или мучных изделий, в качестве сырья для получения очищенных кукурузных белковых продуктов либо в качестве сырья для получения других продуктов, получаемых из зерна, содержащего повышенное содержание лизина по сравнению с нетрансгенным зерном подобного сорта.

Общее содержание лизина в кукурузном зерне, составляющее примерно 4000 частей на миллион (ppm), является достаточным для того, чтобы в получаемые из этого зерна пищевые продукты или корма не нужно было добавлять лизин из дополнительных источников. Продукция и накопление лизина в кукурузе с повышенным содержанием этой аминокислоты по настоящему изобретению достигает вышеуказанного уровня. Настоящее изобретение относится к способам и композициям, значительно улучшенным по сравнению с ранее описанными способами и композициями для повышения содержания лизина в кукурузном зерне (см., например, патент США № 5773691).

Способы повышения содержания аминокислот в трансгенных растениях включают экспрессию рекомбинантных молекул ДНК, кодирующих белки, вовлеченные в пути синтеза аминокислот, на более высоком уровне по сравнению с экспрессией нативных генов. Одним из способов повышения содержания лизина в кукурузе является экспрессия бактериальной дигидродипиколинатсинтазы (DHDPS) согласно раскрытому в патентах США № 5288300, 6459019, а также в публикации патентной заявки США № 2003/0056242A1, и подавление эндогенной LKR (публикация патентной заявки США № 2005/0193444); каждая из вышеприведенных в данном абзаце публикаций полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Любое из растений или их частей по настоящему изобретению может быть переработано для получения корма, муки тонкого и грубого помола, белковых продуктов или масла. Особенно предпочтительной для этих целей частью растений является семя. В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения корм, мука тонкого и грубого помола, белковые продукты или масло используются для кормления сельскохозяйственных животных (скота). Способы получения корма, муки тонкого и грубого помола, белковых продуктов или масла известны в данной области техники, см., например, патенты США № 4957748, 5100679, 5219596, 5936069, 6005076, 6146669 и 6156227, полностью включенных в настоящее описание посредством ссылки. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения белковые продукты представляют собой продукты с высоким содержанием белка, такие как концентраты или изоляты. Продукт с высоким содержанием белка имеет содержание белка, превышающее 5% масс./об., предпочтительно более 10% масс./об., еще более предпочтительно 15% масс./об.

В другом воплощении мука по настоящему изобретению может быть смешана с другими мучными продуктами. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения мука, полученная из растений или семян по настоящему изобретению либо при помощи способа по настоящему изобретению составляет более чем примерно 0,5%, примерно 1%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 25%,

примерно 50%, примерно 75% или примерно 95% по объему или массе мучного компонента любого продукта. В другом воплощении настоящего изобретения мучной продукт может быть смешан и составлять более примерно 10%, более примерно 25%, более примерно 35%, более примерно 50% или более примерно 75% от смеси по объему. Настоящее изобретение также относится к способу усиления интенсивности роста человека или низшего животного, включающему употребление человеком или низшим животным пищи, по крайней мере часть которой представляет собой кукурузу с высоким содержанием лизина, содержащую одну или несколько кассет, для экспрессии в растениях по настоящему изобретению. В настоящем описании термин «низшие животные» относится к птицам, рыбам, а также млекопитающим.

Рекомбинантные ДНК-конструкции

Настоящее изобретение относится к ДНК-конструкциям, содержащим функционально связанные полинуклеотиды, способные обеспечить повышенное содержание лизина в зернах кукурузы. Термин «ДНК-конструкция» включает без ограничения полинуклеотидные молекулы, которые управляют транскрипцией связанных полинуклеотидных молекул в клетке растения. По меньшей мере часть ДНК-конструкции по настоящему изобретению может использоваться в способе трансформации растительной клетки, что подразумевает стабильное встраивание этой части ДНК-конструкции в геном данной клетки. Эта часть обуславливает наличие фенотипа, характеризующегося высоким содержанием лизина в зернах кукурузы или мучных продуктах, изготовленных из таких зерен, и является аспектом настоящего изобретения. ДНК-конструкции pMON93092 и pMON09093 были депонированы Monsanto Technology LLC согласно Будапештскому соглашению в Американской коллекции типовых культур (АТСС) под номерами доступа РТА-6733 и РТА-6734 соответственно. Данные депозиты составляют часть раскрытия настоящего изобретения, и, хотя последовательности, приведенные в настоящем письменном раскрытии, по мнению авторов, являются точными, при необходимости полинуклеотидные последовательности молекул ДНК, содержащие регуляторные элементы, кодирующие и не кодирующие молекулы, могут быть определены при помощи этих депозитов и использованы для коррекции последовательностей, раскрытых в настоящем изобретении.

Полинуклеотидные молекулы связаны в рекомбинантных ДНК-конструкциях при помощи способов, известных специалистам в данной области. Примером пригодной технологии создания ДНК-конструкций может служить технология клонирования GATEWAY™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California), в которой применяется сайт-специфичная реакция клонирования LR-рекомбиназы в системе *Integrase/att* бактериофага лямбда для создания векторной конструкции без использования эндонуклеаз и лигаз. В руководстве по использованию технологии клонирования GATEWAY™ компании Invitrogen также приводятся четкие инструкции по стандартному клонированию любого желаемого полинуклеотида в вектор, содержащий действующие элементы для экспрессии в клетках растений. Дополнительные способы раскрыты в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е издание, тома 1, 2 и 3. J.F. Sambrook, D.W. Russell и N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 (в настоящем тексте ссылки на данный источник приводятся как «Sambrook с соавторами»).

Используемый в настоящем описании термин «экзогенная ДНК или выделенная ДНК» относится к молекуле ДНК, которая в норме не присутствует в геноме клетки-хозяина, или же к ДНК, которая в норме не присутствует в геноме клетки-хозяина в

идентичном контексте, или же к двум связанным прилегающим друг к другу последовательностям, которые в норме или в природе не связаны друг с другом. Экзогенная ДНК может включать полинуклеотидную молекулу ДНК или РНК, которая является нативной для генома клетки-хозяина, или же может содержать нативный полинуклеотид, измененный путем присоединения или делеции одного или нескольких полинуклеотидов или же путем модификаций регуляторных элементов ассоциированного полинуклеотида или другой полинуклеотидной последовательности согласно описанному в настоящем описании. В дополнение к регуляторным элементам экзогенная ДНК может содержать кодирующую последовательность, продуктом которой является белок или полипептид, или же некодирующую последовательность, продуктом которой является небелковый продукт, такой как, например, молекула РНК, оказывающая влияние на транскрипцию или трансляцию другой последовательности ДНК. ДНК-конструкция по настоящему изобретению содержит кодирующую и некодирующую последовательности.

Используемые для трансформации растительных клеток экзогенные ДНК-конструкции содержат представляющую интерес кодирующую последовательность, а также обычно другие регуляторные элементы согласно описанному в настоящем описании, такие как (без ограничения) промоторы, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области, лидерные последовательности, последовательности сигналов локализации и транзитных сигналов, а также энхансеры, функциональное соединение которых обуславливает экспрессию РНК в клетках растений. Подобные ДНК-конструкции в контексте настоящего изобретения называются кассетами для гетерологичной экспрессии в растениях. ДНК-конструкции, перечисленные в таблице 1, иллюстрируют связи регуляторных элементов в экспрессионных кассетах, которые экспрессируют кодирующие и некодирующие последовательности; помимо этого также указан средний уровень лизина в трансгенных семенах маиса, содержащих каждую конструкцию. Примерами молекул промоторов ДНК экзогенной ДНК-конструкции по настоящему изобретению могут служить промоторы, усиливаемые в семени или семяспецифические промоторы, включающие, например, промоторы, используемые в однодольных сельскохозяйственных культурах, такие как кукурузный L3-промотор (промотор, описанный в патенте США № 6433252, включенном в настоящее описание посредством ссылки, или его гомологи; в контексте настоящего изобретения - P-Zm.L3), кукурузный B32-промотор (последовательность SEQ ID NO:4 или ее гомологи; в контексте настоящего изобретения - P-Zm.B32), промотор кукурузного гамма-коиксина (промотор, описанный в патенте США № 6635806, включенном в настоящее описание посредством ссылки, или его гомологи; в контексте настоящего изобретения - P-Zm.Gcx), а также любой из промоторов, используемых в ДНК-конструкциях по настоящему изобретению, либо другие промоторы, индуцирующие повышенную транскрипцию в семенах кукурузы; все подобные промоторы в контексте настоящего изобретения обозначаются как P-Zm.seed. Примеры дополнительных промоторов, функционирующих в семенах, включают без ограничения промоторы, индуцирующие экспрессию запасных белков семян, таких как рисовый глутелин и проламиновые белки *Triticeae*, а также промоторы, контролирующие экспрессию ферментов, вовлеченных в синтез крахмала в семени, таких как промоторы, активирующие экспрессию АДФ-глюкоза-крахмал-гликозилтрансферазы однодольных растений. Выбранный промотор семени функционально связан с кодирующей областью гена DHDPS (например, последовательность SEQ ID NO:1, в контексте настоящего изобретения обозначаемая

как CORgl.dapA) либо с кодирующей областью гена аспартаткиназы (например, последовательность SEQ ID NO:3). Дополнительные промоторы, усиливаемые в семени, или семяспецифические промоторы, известны в данной области и могут быть
5 выбраны и протестированы в функциональной связи с кодирующими и некодирующими молекулами ДНК по настоящему изобретению при помощи способов, описанных в контексте настоящего изобретения, либо подобных способов, известных специалистам в области молекулярной биологии растений. Промотор, усиливаемый в семени, первично экспрессируется во всем семени или его части, хотя
10 может быть вторично экспрессирован в других клетках, тканях или органах растения. Части семени включают без ограничения зародыш, эндосперм, семенную оболочку, колеоптиль, семядолю, подсемядольное колено, алейроновый слой, перикарпий и скutelлум. Дополнительные регуляторные элементы, содержащиеся в ДНК-конструкциях, включают без ограничения интрон (I-), транзитные сигналы (TS-), 5'-нетранслируемые лидерные последовательности (L-), 3'-области
15 полиаденилирования (T-) или некодирующие антисмысловые области. Также могут быть включены экспрессионные кассеты, содержащие селектируемый или количественно оцениваемый маркер для селекции или идентификации трансформированных растительных клеток и тканей. Конструкция по настоящему изобретению необязательно содержит экспрессионную кассету, которая придает кукурузному растению устойчивость к глифосату и может быть использована в качестве селектируемого маркера. Используемый в настоящем описании термин «трансген» относится к экзогенной ДНК, встроенной в геном хозяина или способной
20 к автономной репликации в клетке-хозяине, экспрессирующей один или несколько клеточных продуктов. При помощи подобных трансгенов можно получить клетку-хозяина, получаемые из нее растения или части этих растений с новым по сравнению с нетрансформированной клеткой или растением фенотипом, например с повышенным содержанием лизина в кукурузном зерне. Трансгены могут быть непосредственно
25 введены в растения при помощи генетической трансформации и предпочтительно являются стабильными и наследуемыми таким образом, что они могут быть унаследованы от растений любого предыдущего поколения, которые были трансформированы экзогенной ДНК.

Используемый в настоящем описании термин «ген» или «кодирующая последовательность» относится к молекуле ДНК, с которой транскрибируется молекула РНК. Молекула ДНК содержит область (CR-), кодирующую мРНК, которая, в свою очередь, кодирует белковый продукт, либо РНК, которая функционирует как
40 молекула, подавляющая ген, либо структурные молекулы РНК, такие как тРНК, рРНК, snРНК либо другие молекулы РНК. Используемый в настоящем описании термин «экспрессия» относится к комбинации внутриклеточных процессов, включающих транскрипцию и трансляцию, при помощи которых молекула ДНК, такая как ген, продуцирует полипептид или молекулу РНК. Примером кодирующей
45 последовательности является ген дигидродипиколинатсинтазы *Corynebacterium* (DHDPS; Vonnassie с соавторами, 1990; Richaud с соавторами, 1986), пригодный для получения кукурузных зерен с повышенным содержанием лизина. Кукурузное растение, трансформированное таким образом, что оно содержит и экспрессирует ген DHDPS *Corynebacterium* или любой другой ген, экспрессия которого
50 приводит к повышению содержания лизина в ткани зерна, в контексте настоящего изобретения также называется кукурузным растением с повышенным содержанием лизина. Кодированная область гена DHDPS *Corynebacterium* согласно настоящему

изобретению дополнительно модифицируется для повышения экспрессии в растительных клетках, предпочтительно в клетках однодольных растений и наиболее предпочтительно в клетках кукурузы. Модифицированная кодирующая область гена *DHDPS Corynebacterium*, используемая в контексте настоящего изобретения, соответствует последовательности SEQ ID NO:5, обозначаемой в настоящем описании как CORgl.dapA.nno.

Используемый в настоящем описании термин «промотор» относится к области последовательности ДНК, инициирующей транскрипцию РНК с ДНК. Промоторы расположены с 5'-конца смысловой цепи транскрибируемой молекулы ДНК и содержат области, служащие в качестве сайтов связывания для РНК-полимеразы, а также области, вовлеченные во взаимодействия с другими факторами, индуцирующими транскрипцию РНК. Более конкретно, базальные промоторы растений содержат канонические области, ассоциированные с инициацией транскрипции, такие как СААТ- и ТАТА-боксы. В контексте настоящего изобретения предпочтительные молекулы промоторов и 5'-нетранслируемые молекулы индуцируют транскрипцию в клетках семян или тканей на более высоком уровне, чем в других клетках или тканях растения. Молекулы промоторов могут быть выбраны из числа молекул, известных в данной области, например из промоторов, описанных в патенте США № 6437217 (кукурузный RS81-промотор), в патенте США № 5641876 (промотор рисового актина), в патенте США № 6426446 (кукурузный RS324-промотор), в патенте США № 6429362 (кукурузный PR-1-промотор), в патенте США № 6232526 (кукурузный А3-промотор), в патенте США № 6177611 (конститутивный кукурузный промотор), в патентах США № 5322938, 5352605, 5359142 и 5530196 (35S-промотор), в патенте США № 6433252 (кукурузный L3-промотор олеозина, P-Zm.L3), в патенте США № 6429357 (промотор рисового актина 2, а также интрон рисового актина 2), в патенте США № 5837848 (специфичный для корней промотор), в патенте США № 6294714 (светоиндуцируемый промотор), в патенте США № 6140078 (солеиндуцируемый промотор), в патенте США № 6252138 (патоген-индуцируемый промотор), в патенте США № 6175060 (промотор, индуцируемый недостатком фосфора), в патенте США № 6635806 (промотор гамма-коиксина, P-CI.Gcx) и в патентной заявке США № 09/757089 (промотор хлоропластной альдолазы кукурузы); все вышеперечисленные публикации включены в настоящее описание посредством ссылки. Помимо этого могут быть сконструированы химерные промоторные молекулы, содержащие цис-элементы, полученные из гетерологичных источников, которые дополнительно улучшают экспрессионный профиль промотора, используемого в контексте настоящего изобретения. Например, было показано, что элементы промоторов растительных вирусов повышают эффективность промоторных элементов растений, функционально связанных вирусными промоторами (патент США № 6660911, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Помимо промотора ДНК-конструкции, используемые для трансформации растений, обычно также содержат другие регуляторные элементы, такие как, без ограничения, 3'-нетранслируемые области (содержащие сайты полиаденилирования), транзитные или сигнальные пептиды для направления белка в определенные клеточные органеллы растений, в частности в хлоропласты, лейкопласты и другие пластидные органеллы.

Специалистам в данной области известны различные интроны, энхансеры, транзитные пептиды, нацеливающие сигнальные последовательности. 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), полезные для конструирования эффективных векторов для экспрессии в растениях, подобных раскрытым, например, в публикации

патентной заявки США № 2003/01403641 (включенной в настоящее описание посредством ссылки).

5 5'-UTR, функционирующий как трансляционная лидерная последовательность, представляет собой генетический ДНК-элемент, локализованный между промоторной и кодирующей последовательностями гена. Трансляционная лидерная последовательность присутствует в полностью процессированной мРНК с 5'-конца от последовательности начала трансляции. Трансляционная лидерная последовательность может оказывать влияние на процессинг первичного транскрипта в мРНК либо на стабильность мРНК или эффективность трансляции. Примеры трансляционных лидерных последовательностей включают лидерные последовательности генов белков теплового шока кукурузы и петунии (патент США № 5362865), лидерные последовательности генов оболочечных белков вирусов растений, лидерные последовательности растительных генов рибулозабисфосфаткарбоксылазы/оксигеназы (Rubisco) и т.д. (Turner и Foster, 1995). Примерами лидерных молекул, в естественном контексте ассоциированных с промоторными молекулами, описанными в контексте настоящего изобретения, могут служить лидерная последовательность В32 кукурузы (L-Zm.V32), лидерная последовательность рисового актина 1 (L-Os.Act1) и лидерная последовательность гамма-коиксина (L-CI.Gcx).

3'-нетранслируемая область (3' UTR) или 3'-область полиаденилирования представляет собой молекулу ДНК, связанную со структурной полинуклеотидной молекулой и локализованную с 3'-конца от последней, и содержит полинуклеотиды, содержащие сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, влияющие на транскрипцию, процессинг мРНК или экспрессию генов. Функция сигнала полиаденилирования в растениях состоит в запуске полиаденилирования, т.е. добавления полиаденилатнуклеотида к 3'-концу предшественника мРНК. Последовательность полиаденилирования может быть получена из природного гена, из множества растительных генов либо из Т-ДНК генов агробактерий. Примерами 3'-UTR могут служить 3'-область нопалинсинтазы (nos 3'; Fraley с соавторами, 1983), 3'-UTR-последовательности гена hsp17 пшеницы (T-Ta.Hsp17) и T-Ps.RbcS2:E9 (малая субъединица рибулозабисфосфаткарбоксылазы/оксигеназы (rubisco) гороха), 3'-UTR-последовательности, раскрытые в патенте № WO0011200A2, а также другие известные в данной области техники 3'-UTR-последовательности, которые могут быть протестированы и использованы в комбинации с кодирующими областями DHDPS или АК и в настоящем описании обозначаются как Т-3'UTR.

40 Под термином «транзитные сигналы» в целом понимают пептидные молекулы, которые, будучи связанными с представляющим интерес белком, направляют последний в ту или иную ткань, клетку, внутриклеточный компартмент или клеточную органеллу. Примеры подобных пептидов включают без ограничения хлоропласт-транзитные пептиды, сигналы ядерной локализации и вакуолярные сигналы. В контексте настоящего изобретения особо применимыми являются пластид-транзитные пептиды, направляющие экспрессию фермента DHDPS в пластиды клеток семян. Хлоропласт-транзитный пептид (СТР) может быть получен в виде химерной конструкции, в которой СТР слит с N-концом белка, предназначенного для транспорта в хлоропласты. Множество белков, локализованных в хлоропластах, экспрессируются ядерными генами в виде предшественников и далее направляются в хлоропласты за счет СТР, удаляемого в ходе процессов, связанных с импортом белка в хлоропласты. Примеры хлоропластных белков включают малую субъединицу (RbcS2)

рибулоза-1,5-бисфосфат-карбоксилаза, ферредоксин, ферредоксин-оксидоредуктаза, белки 1 и 2 светособирающего комплекса и тиоредоксин F. Было продемонстрировано, как *in vivo*, так и *in vitro*, что нехлоропластные белки могут быть перенаправлены в хлоропласты путем использования химерных СТР-слитых белков, а также что наличие СТР является достаточным условием для направления белка в хлоропласты. Было показано, что встраивание подходящего хлоропласт-транзитного пептида, такого как СТР генов EPSPS *Arabidopsis thaliana* (Klee с соавторами, 1987) и *Petunia hybrida* (della-Cioppa с соавторами, 1986), приводит к направлению гетерологичных белков в хлоропласты трансгенных растений. СТР гена DapA *Zea mays* (SEQ ID NO:6, в настоящем описании обозначаемая как TS-Zm.DapA) согласно настоящему изобретению может быть применен для направления связанного с ним полипептида DHDPS в пластиды семян. Специалистам в данной области будет понятно, что могут быть получены различные химерные конструкции, в которых используется функциональность специфического СТР для импорта гетерологичного полипептида DHDPS в пластиды растительной клетки. Описание использования хлоропласт-транзитных пептидов приведено в патенте США № 5188642, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки.

В таблице 1 приведены комбинации промоторов и других регуляторных элементов, функционально связанных с молекулами, подавляющими ген LKR, и с кодирующими молекулами DHDPS, а также соответствующие эффекты в отношении содержания лизина в растениях и зернах кукурузы. Специалисту в данной области будет ясно, что экзогенные молекулы ДНК со сходными свойствами могут быть заменены молекулами, перечисленными в таблице 1, и протестированы при помощи способов, описанных в настоящем описании, а также других сходных способов, пригодных для определения уровня лизина в растительных тканях, зернах, а также полученной из них продукции.

ДНК-конструкции по настоящему изобретению могут необязательно содержать селективируемую или количественно оцениваемую маркерную молекулу. Особо важными являются селективируемые маркерные молекулы, которые также придают растениям ценное агрономическое свойство, например устойчивость к гербицидам. Гербициды, устойчивости к которым была продемонстрирована для трансгенных растений и к которым могут быть применены способы по настоящему изобретению, включают, без ограничения, глифосат, глюфосинат, сульфонилмочевины, имидазолиноны, бромксинил, далапон, циклогександион, ингибиторы протопорфириногенаксидазы, а также изоксафлютоловые гербициды.

Полинуклеотидные молекулы, кодирующие белки, вовлеченные в контроль устойчивости к гербицидам, хорошо известны в данной области и включают, без ограничения, полинуклеотидные молекулы, кодирующие 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS, патенты США № 5627061; 5633435; 6040497; Padgett с соавторами, 1996; Penaloza-Vazquez с соавторами, 1995; и *aroA* (патент США № 5094945), устойчивость к глифосату; бромксинилнитрилазу (*Bxn*), стойчивость к бромксинилу (патент США № 4810648); фитоендесатуразу (*crtI*, Misawa с соавторами, 1993 и 1994); устойчивость к норфлуразону, ацетогидроксиацидсинтазу (AHAS, *aka* ALS, Sathasiivan с соавторами, 1990); и ген *bar* для устойчивости к глюфосинату и биалафосу (DeBlock с соавторами, 1987).

Устойчивость к гербицидам является желательным фенотипом для сельскохозяйственных культур. ДНК-конструкции по настоящему изобретению предпочтительно содержат экспрессионную кассету, наличие которой предоставляет

трансформированному кукурузному растению устойчивость к глифосату. Также экспрессионная кассета позволяет проводить селекцию трансформированных клеток кукурузы в глифосатсодержащей среде. Экспрессионная кассета предпочтительно содержит промотор, активирующий транскрипцию гена, кодирующего устойчивую к глифосату EPSPS, во всех клетках трансформированного растения. В частности, экспрессионная кассета, обуславливающая наличие устойчивости к глифосату, содержит промотор и интрон рисового актина 1 (P-Os.Act1, I-Os.Act1, патент США № 5641876, включенный в настоящее описание посредством ссылки), функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим хлоропласт-транзитный пептид, а также с полинуклеотидом, кодирующим устойчивую к действию глифосата EPSPS штамма CP4 *Agrobacterium* (в настоящем описании обозначается как aroA:CP4 EPSPS, см. патент США № 5633435, включенный в настоящее описание посредством ссылки). N-фосфометилглицин, также известный как глифосат, является хорошо известным гербицидом с фитотоксической активностью, направленной против широкого спектра растительных видов. Глифосат является активным ингредиентом гербицида Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO), безопасного гербицида с коротким временем полужизни в окружающей среде. При нанесении на поверхность растения глифосат системно проникает в растение. Токсичность глифосата по отношению к растениям обусловлена блокадой шикиматного метаболического пути, связанного с синтезом предшественника ароматических аминокислот. Более конкретно, глифосат нарушает конверсию фосфоенолпирувата и 3-фосфошикимовой кислоты в 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат путем блокирования фермента 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (далее обозначаемой как EPSP-синтаза или EPSPS). В контексте настоящего изобретения термин «глифосат» относится к любой гербицидно-эффективной форме N-фосфометилглицина (включая любые его соли), а также к любым другим веществам, превращающимся в глифосат-анион *in planta*. Глифосат и N-фосфометилглицин, а также его соли используются в качестве компонентов культуральных сред для селекции бактериальных и растительных клеток, устойчивых к глифосату, либо используются для биохимических анализов устойчивости к этим веществам соответствующих ферментов *in vitro*. Примеры коммерческих препаратов глифосата включают без ограничения гербицидные препараты, продаваемые Monsanto Company под торговыми марками ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® и ACCORD®, содержащие глифосат в виде изопропиламмониевой соли; гербицидные препараты, продаваемые Monsanto Company под торговыми марками ROUNDUP® DRY и RIVAL®, содержащие глифосат в виде аммониевой соли; препарат, продаваемый Monsanto Company под торговой маркой ROUNDUP® GEOFORCE, содержащий глифосат в виде натриевой соли; препарат, продаваемый Monsanto Company под торговой маркой ROUNDUP® WEATHERMAX, содержащий глифосат в виде калиевой соли; а также препарат, продаваемый Zeneca Limited под торговой маркой TOUCHDOWN®, содержащий глифосат в виде триметилсульфониевой соли. Глифосатсодержащие гербицидные препараты могут быть безопасно нанесены с воздуха на устойчивые к глифосату сельскохозяйственные культуры для контроля численности сорняков на полях в количествах от 8 до 64 унций/акр. В экспериментальных условиях глифосат может быть нанесен на устойчивые к действию глифосата сельскохозяйственные культуры в количествах от 4 до более чем 128 унций/акр без значительного повреждения сельскохозяйственных культур. Выбор

количества наносимого глифосатсодержащего препарата, составляющего биологически эффективную дозу, находится в области компетенции специалиста-агронома. Для ознакомления с получением трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, см. публикации патентных заявок США № 2003/0106096A1 и 2002/0112260A1, а также патенты США № 5034322, 6107549 и 6376754, каждый(ая) из которых включен(а) в настоящее описание посредством ссылки. Настоящее изобретение относится к кукурузным растениям с повышенным содержанием лизина и опционально устойчивым к глифосату.

В ходе трансформации экзогенная ДНК может быть встроена в геном растения произвольно, т.е. не сайт-специфично. В некоторых случаях может быть полезным направить встраивание экзогенной ДНК в определенный сайт, т.е. провести сайт-специфичную интеграцию, например заменить существующую последовательность гена или геномной области. В некоторых других случаях может быть полезным направить встраивание экзогенной ДНК в определенный сайт, про который известно, что в нем имеет место экспрессия гена(ов). Существует несколько сайт-специфичных рекомбинационных систем, функционирующих в растениях, в том числе Cre/Lox-система, раскрытая в патенте США № 4959317 и FLP/FRT-система, раскрытая в патенте США № 5527695; вышеприведенные в данном абзаце публикации включены в настоящее описание посредством ссылки.

Полезные маркерные селективируемые гены представляют собой гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, таким как ампициллин, канамицин (nptII), гигромицин В (*aph IV*) и гентамицин (*aac3* и *aacC4*), либо селективируемые маркерные гены, описанные в патентах США № 5550318, 5633435, 5780708 и 6118047, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Также могут быть использованы скрининговые маркеры, предоставляющие возможность визуально идентифицировать трансформанты, например гены, экспрессирующие цветные или флуоресцентные белки, такие как люцифераза или зеленый флуоресцентный белок (GFP), либо ген, экспрессирующий *бета*-глюкоуронидазу, или ген *uidA* (GUS), для которых известны различные хромогенные субстраты.

Подавление генов

ДНК-конструкция по настоящему изобретению обеспечивает экспрессию антисмысловой молекулы РНК, подавляющей эндогенный ген LKR (лизинкетоглутаратредуктаза (LKR, бифункциональный растительный фермент, также известный как сахаропиндегидрогеназа SDH) в трансгенной растительной клетке. Подобная ДНК-конструкция содержит промотор, активный в ткани, в которой планируется подавить действие целевого фермента, а также транскрибируемую последовательность ДНК-элемента, комплементарную полинуклеотидной последовательности гена LKR, экспрессию которого планируется подавить. Целевой генный элемент, последовательность которого «копируется» для использования в качестве транскрибируемой ДНК в конструкции для подавления экспрессии гена, может представлять собой промоторный элемент, интронный элемент, экзонный элемент либо 5'- или 3'-UTR-элемент. Хотя минимальная длина фрагмента ДНК, «копированного» с последовательности гена, экспрессию которого планируется подавить, составляет примерно 21 или 23 нуклеотида, предпочтительными являются более длинные сегменты, например, вплоть до полноразмерной последовательности целевого гена. ДНК-элемент может содержать несколько фрагментов гена, например нуклеотиды, комплементарные непрерывным или отдельным генным элементам,

соответствующим UTR, экзону и интрону. Подобные конструкции могут также содержать в соответствии с необходимостью другие регуляторные элементы, ДНК-фрагменты, кодирующие транзитные пептиды, сигнальные пептиды, селекционные и скрининговые маркеры. Для получения антисмысловым образом ориентированной РНК-петли длина комплементарного ДНК-элемента условно составляет не более половины длины антисмысловым образом ориентированного ДНК-элемента, часто не более одной трети от длины антисмысловым образом ориентированного ДНК-элемента, например не более одной четверти от длины вышеупомянутого антисмысловым образом ориентированного ДНК-элемента. Общая длина комбинации ДНК-элементов может варьироваться. Например, длина антисмысловым образом ориентированного ДНК-элемента может составлять от 500 до 5000 нуклеотидов, а длина комплементарного ДНК-элемента может составлять от 50 до 500 нуклеотидов.

Дизайн антисмысловой транскрипционной единицы может быть проведен таким образом, чтобы подавлять экспрессию множества генов или членов генного семейства, при этом ДНК содержит два или более антисмысловым образом ориентированных элементов, полученных из различных генов, например комплементарных по меньшей мере части 5'-антисмыслового элемента.

Подавление экспрессии включает в себя хорошо известные способы подавления транскрипции гена или накопления соответствующей этому гену мРНК, препятствующих трансляции транскрипта в белок. Посттрансляционное подавление экспрессии опосредуется транскрипцией интегрированной рекомбинантной ДНК с последующим формированием двуцепочечной РНК (дцРНК), гомологичной гену, экспрессию которого планируется подавить. Образование дцРНК обычно происходит в результате транскрипции интегрированного инвертированного повтора целевого гена и является обычным событием при использовании способов подавления экспрессии, известных как антисмысловое подавление, косупрессия или РНК-интерференция (RNAi). Транскрипционное подавление может быть опосредовано транскрибируемой дцРНК, гомологичной промоторной последовательности ДНК - эффект, называемый *транс*-супрессией промотора.

Более конкретно, посттрансляционное подавление экспрессии гена, достигаемое путем встраивания рекомбинантной ДНК-конструкции, содержащей антисмысловым образом ориентированный ДНК-фрагмент, для регуляции экспрессии гена в клетках растений, раскрыто в патентах США № 5107065 (Shewmaker с соавторами) и 5759829 (Shewmaker с соавторами). Трансгенные растения, трансформированные при помощи подобных антисмысловым образом ориентированных ДНК-конструкций, предназначенных для подавления транскрипции генов, могут содержать инвертированный повтор, возникающий в результате встраивания ДНК-конструкции в растения при помощи агробактериальной трансформации согласно раскрытому Redenbaugh с соавторами (1992). Вставки инвертированных повторов могут содержать всю Т-ДНК-конструкцию или ее часть, например инвертированный повтор полной транскрипционной единицы либо инвертированный повтор последовательности терминации транскрипции. Скрининг на встроенную ДНК, содержащую инвертированные повторы, может повысить эффективность идентификации трансформационных событий, эффективных для «сайленсинга» генов, при этом трансформирующая конструкция может представлять собой простую антисмысловую ДНК-конструкцию, которая должна быть встроена в нескольких копиях, или же комплексную инвертированную ДНК-конструкцию (например, RNAi-

конструкцию), которая может быть встроена в единственной копии. ДНК-конструкция, составляющая предмет настоящего изобретения, может содержать несколько инвертированных повторов, встроенных в регуляторный элемент, например в интрон. Инвертированный повтор содержит молекулу ДНК, гомологичную и комплементарную эндогенному гену LKR растительной клетки-хозяина. В контексте настоящего изобретения молекула ДНК (SEQ ID NO:9, dsSDH bfx, также обозначается как LKR dsRNA bfx) является гомологичной фрагменту ДНК, кодирующему LKR/SDH *Zea mays* (SEQ ID NO:2) и используется для подавления экспрессии нативных кукурузных генов LKR/SDH. Обозначение bfx относится к последовательности молекулы дцРНК, используемой для подавления экспрессии, которая была специально отобрана при помощи анализа целевой молекулы после исключения родственных целевых последовательностей, найденных в других организмах. В некоторых описанных в настоящем описании конструкциях LKR фрагмент dsRNA bfx встроен в интрон (Zm.LKR dsRNA bfx, встроенный в I-Zm.DnaK, SEQ ID NO:10). Дополнительные полинуклеотиды, гомологичные и комплементарные последовательности гена LKR *Zea mays*, также могут быть выбраны для использования в контексте настоящего изобретения.

Функционирование гена также может быть нарушено при помощи подавления экспрессии, достигаемого за счет инсерционных мутаций, создаваемых мобильными генетическими элементами. Например, многие двудольные растения могут быть легко трансформированы агробактериальной T-ДНК, в результате чего может быть быстро получено большое число трансформированных растений. Помимо этого существуют линии некоторых видов, таких как *Zea mays*, содержащих активные мобильные генетические элементы, которые могут быть эффективно использованы для генерирования большого числа инсерционных мутаций, хотя другие виды лишены подобных возможностей. Мутантные растения с нарушенной экспрессией интересующего полипептида, полученные при помощи агробактериальной трансформации или мутагенеза, опосредованного мобильными генетическими элементами, могут быть идентифицированы при помощи полинуклеотидов, составляющих предмет настоящего изобретения. Например, многочисленная популяция мутантных растений может быть проскринирована при помощи полинуклеотидов, кодирующих интересующий полипептид, для идентификации мутантных растений со встроенным геном, кодирующим интересующий полипептид.

Белковые молекулы

Белки, составляющие предмет настоящего изобретения, представляют собой полноразмерные белки либо по меньшей мере фрагменты полноразмерных белков, достаточные для реализации релевантной биологической активности полноразмерного белка, например повышения содержания лизина в трансгенном кукурузном зерне. Термин «белок» также включает в себя молекулы, состоящие из одной или более полипептидных цепей. Таким образом, полезный белок в контексте настоящего изобретения может представлять собой продукт полноразмерного гена либо один или более функциональных фрагментов естественного белка, предоставляющих желаемое агрономическое свойство согласно настоящему изобретению, т.е. повышенное содержание лизина.

Гомологи белков, составляющих предмет настоящего изобретения, могут быть идентифицированы при помощи сопоставления аминокислотных последовательностей белков DHDPS (SEQ ID NO:7) или аспараткиназы (SEQ ID NO:8) с аминокислотными последовательностями белков тех же или других растительных или бактериальных

организмов, например, вручную либо при помощи известных поисковых алгоритмов, основанных на поиске гомологии, таких как BLAST, FASTA и алгоритм Smith-Waterman.

5 В другом аспекте настоящее изобретение относится к последовательностям, кодирующим функциональные гомологичные белки, отличающиеся от белков DHDPS и аспартаткиназы согласно настоящему изобретению на одну или более аминокислот; возникновение подобных белков является результатом хорошо известных консервативных аминокислотных замен, например замена на валин является
10 консервативной для аланина, а треонин - консервативной заменой для серина. При экспрессии подобных гомологичных белков в трансгенном растении они будут оказывать эффекты, практически эквивалентные таковым, оказываемым белками DHDPS или аспартаткиназы.

15 Консервативные замены для той или иной аминокислоты в нативной последовательности белка могут быть выбраны из других членов класса, к которому принадлежит данная природная аминокислота. Типичные аминокислоты, принадлежащие к различным классам, включают в себя без ограничения (1) кислые (отрицательно заряженные) аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота и
20 глутаминовая кислота; (2) основные (положительно заряженные) аминокислоты, такие как аргинин, гистидин и лизин; (3) нейтральные полярные аминокислоты, такие как глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин; и (4) нейтральные неполярные (гидрофобные) аминокислоты, такие как аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Консервативные замены для той
25 или иной аминокислоты в нативной последовательности белка могут быть выбраны из других членов группы, к которой принадлежит данная природная аминокислота. Например, группа аминокислот с алифатическими боковыми цепями включает в себя глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот с боковыми
30 гидроксилсодержащими алифатическими цепями включает в себя серин и треонин; группа аминокислот с амидосодержащими боковыми цепями включает в себя аспарагин и глутамин; группа аминокислот с ароматическими боковыми цепями включает в себя фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот с
35 основными боковыми цепями включает в себя лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот с серосодержащими боковыми цепями включает в себя цистеин и метионин. Группами, в которых происходят природные консервативные аминокислотные замены, являются аминокислотные пары валин-лейцин, валин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, аспарагиновая
40 кислота-глутаминовая кислота и аспарагин-глутамин.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к белкам, отличающимся от описанных белковых последовательностей DHDPS и аспартаткиназы на одну или более аминокислот; возникновение подобных белков является результатом инсерции или делеции одной или более аминокислот в нативной последовательности. При
45 экспрессии подобных гомологичных белков в трансгенном растении они будут оказывать эффекты практически эквивалентным образом, например обеспечивать повышение содержание лизина в кукурузном зерне.

Белки, составляющие предмет настоящего изобретения и являющиеся вариантами
50 белков, к которым относится настоящее изобретение, в общем случае демонстрируют значительную степень идентичности с последними, такую как по меньшей мере 50% и более, например по меньшей мере 60% или 70% идентичности с белками DHDPS и аспартаткиназы. Полезные белки также включают в себя белки, демонстрирующие

еще большую идентичность с аминокислотами белковых сегментов белков DHDPS и аспараткиназы, например, 80%, 90%, 95%, 98% или до 99% идентичности.

Способы трансформации и трансформированные растения

В контексте настоящего изобретения термин «кукуруза» относится к *Zea mays*, также известному как кукуруза, и включает в себя все виды растений, которые могут быть скрещены с кукурузой, включая дикие сорта кукурузы.

В практических воплощениях настоящего изобретения способы и композиции для трансформации растений посредством встраивания экзогенной ДНК в геном растения могут включать в себя любой из хорошо известных и продемонстрированных способов. Предпочтительными способами трансформации растений являются бомбардировка микрочастицами, описанная в патентах США № 5015580, 5550318, 5538880, 6160208, 6399861 и 6403865, а также трансформация посредством агробактерий, описанная в патентах США № 5635055, 5824877, 5591616, 5981840, 6384301 и патентной публикации 20030196219; все вышеприведенные в данном абзаце публикации полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Трансформация с помощью микрочастиц относится к способу доставки ДНК, иммобилизованной на поверхности микрочастиц, которыми с помощью различных способов бомбардируется целевая ткань. Трансформация посредством агробактерий проводится при помощи генно-инженерных почвенных бактерий, принадлежащих к роду *Agrobacterium*. Некоторые виды *Agrobacterium* обеспечивают перенос специфической плазмидной ДНК, известной как Т-ДНК, которая может быть подвергнута генно-инженерным манипуляциям для доставки любого желаемого фрагмента ДНК во многие виды растений.

Используемый в настоящем описании термин «трансгенный» организм относится к организму, геном которого содержит экзогенную ДНК или изолированную ДНК. Трансгенным организмом может быть растение, животное, насекомое, гриб, бактерия или вирус. Используемый в настоящем описании термин «трансгенное растение» относится к стабильно трансформированному растению или полученному от него потомству любого поколения, в котором ДНК растения и его потомства содержит экзогенную ДНК. Помимо этого трансгенное растение может содержать также последовательности, нативные для трансформированного растения, в которые была встроена экзогенная ДНК для изменения уровня и паттерна экспрессии гена.

Используемый в настоящем описании термин «стабильно» трансформированное растение относится к растению, в котором экзогенная ДНК наследуется. Экзогенная ДНК может наследоваться в качестве фрагмента ДНК, присутствующего в клетке растения, при этом не встроенного в геном хозяина. Стабильно трансформированное растение предпочтительно содержит экзогенную ДНК, встроенную в хромосомную ДНК в ядре, митохондриях или хлоропластах, более предпочтительно - встроенную в ядерную хромосомную ДНК.

Используемый в настоящем описании термин «трансгенное растение R₀» относится к растению, которое было трансформировано экзогенной ДНК или получено из клетки, каллюса или кластера клеток, которые были трансформированы экзогенной ДНК. Используемый в настоящем описании термин «потомство» относится к последующему поколению, включая семена и полученные из них растения, которые произошли от конкретного родительского растения или нескольких родительских растений; это потомство может быть высоковырожденным или в значительной степени гомозиготным в зависимости от сорта. Потомство трансгенного растения настоящего изобретения может быть, например, оплодотворено путем самоопыления,

скрещено с другим трансгенным растением, скрещено с нетрансгенным растением и/или подвергнуто обратному скрещиванию с родительским растением.

5 Семена растений, составляющие предмет настоящего изобретения, могут быть собраны с плодородных трансгенных растений и могут быть использованы для выведения поколений потомства растений, составляющих предмет настоящего изобретения, включая гибридные линии растений, содержащие в геноме экзогенную ДНК-конструкцию согласно приведенному в таблице 1 настоящего описания, которая обеспечивает трансгенные продукты преимуществом, заключающимся в повышении содержания лизина в кукурузном зерне и опциональном повышении устойчивости к глифосатным гербицидам.

15 Трансгенный «продукт» получают путем трансформации растительной клетки экзогенной ДНК-конструкции, последующей регенерации растения, полученной в ходе специфического встраивания экзогенной ДНК в растительный геном и селекции растения, характеризуемого наличием трансгенной ДНК. Каждый продукт является уникальным индивидом, каждый из которых отличается от других продуктов специфической локализацией геномной вставки экзогенной ДНК-конструкции, составляющей предмет настоящего изобретения. Детектирование трансгенной ДНК осуществляется при помощи любого числа способов обнаружения ДНК, известных специалистам в данной области техники, которые могут быть выполнены с использованием растительных тканей, семян и обработанных трансгенных продуктов, содержащих трансгенную ДНК. Обычно трансформируют несколько растительных клеток, каждая из которых потенциально представляет собой продукт интеграции, 25 отличный от других продуктов, что приводит к получению популяции растений, из которой далее выбирается то или иное конкретное растение. Вследствие того, что локус интеграции в большинстве случаев является стабильным на протяжении повторяющихся репродуктивных циклов растений, термин «продукт» относится к первоначальному трансформанту R_0 и его потомству, которые содержат экзогенную ДНК, встроенную в специфический и уникальный сайт в геноме, т.е. трансгенную ДНК. Потомство, полученное в результате полового ауткроссинга, самооплодотворения или повторного обратного скрещивания, при проведении которых хотя бы одно из используемых в скрещивании растений является потомком трансформанта R_0 любого поколения и содержит ту же трансгенную ДНК.

35 В ходе процессинга семян и зерен, составляющих предмет настоящего изобретения, для получения корма и продуктов питания нормальные структуры тканей растения уничтожаются, клетки растения разрушаются и нативная ДНК и экзогенные экспрессионные кассеты растений могут не остаться полностью интактными, в особенности при обработке с использованием высоких температур, экстрагирующих растворителей и им подобных. Несмотря на это уникальные процессированные продукты, полученные в ходе практических воплощений настоящего изобретения, могут быть легко идентифицированы как содержащие нативную ДНК и фрагменты экзогенных кассет, предназначенных для экспрессии в растениях. Под «фрагментами» 45 подразумеваются изолируемые или амплифицируемые сегменты ДНК длиной по меньшей мере 20 пар оснований. Такие фрагменты могут быть секвенированы или картированы при помощи рестрикционного анализа для подтверждения идентичности их последовательностей нативной ДНК или экзогенными экспрессионными кассетами исходного материала.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры приведены для демонстрации примеров конкретных

предпочтительных воплощений настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что технологии, раскрытые в нижеследующих примерах, представляют собой подходы, которые, по данным авторов настоящего изобретения, хорошо работают в контексте практических реализаций настоящего изобретения и таким образом могут служить примерами предпочтительных практических воплощений настоящего изобретения. Тем не менее, в свете настоящего раскрытия специалисты в данной области техники должны понимать, что раскрытые специфические воплощения могут быть подвергнуты множеству изменений и тем не менее приводить к сходным результатам без выхода за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

Пример 1

ДНК-конструкции и трансформирование растений

ДНК-конструкции, составляющие предмет настоящего изобретения, содержат регуляторные молекулы, функционально связанные с интересующей ДНК. В частности, ДНК-конструкция содержит промотор, интрон, 5'-лидерную последовательность, кодирующую или не кодирующую молекулу и 3'-нетранслируемую область. ДНК-конструкция, составляющая предмет настоящего изобретения, была получена с использованием различных молекулярных способов и инструментов, например, описанных Sambrook с соавторами; в значительной степени схожие конструкции могут быть получены при помощи вариантов данных способов, известных специалистам в области манипуляций с ДНК. Такие методы, как ПЦР-амплификация, клонирование и субклонирование использовались для функционального связывания промоторов, лидерных последовательностей, интронов, транзитных пептидов, кодирующих молекул, не кодирующих молекул и 3'-нетранслируемых областей, приведенных в таблице 1 в функциональных конфигурациях и далее проиллюстрированных на фиг.1-6. ДНК-конструкции были клонированы в один или более плазмидных «скелетов», пригодных для использования в агробактериальной трансформации клеток кукурузы, хотя могут быть выбраны и другие плазмидные «скелеты», например высококопийные плазмиды, для изоляции ДНК-фрагментов и трансформации с использованием микрочастиц либо плазмиды, совместимые с другими бактериальными хозяевами. Для тестирования комбинаций стратегий экспрессии нечувствительного к действию лизинопосредованной петли обратной связи полипептида DHDPS (SEQ ID NO:7) и репрессии катаболизма лизина посредством подавления экспрессии эндогенного гена LKR/SDH кукурузы (SEQ ID NO: 2) или экспрессии гена аспараткиназы (SEQ ID NO:8) были получены 35 конструкций, приведенных в таблице 1. Эти стратегии включают в себя, например: 1) экспрессию дцРНК гена LKR в зародыше; 2) экспрессию полипептида DHDPS и дцРНК гена LKR в зародыше; 3) экспрессию полипептида DHDPS и дцРНК гена LKR в эндосперме; 4) экспрессию полипептида DHDPS в эндосперме и дцРНК гена LKR в зародыше; 5) экспрессию полипептида DHDPS и аспараткиназы, а также экспрессию дцРНК гена LKR.

Получение трансгенных растений

Ткани кукурузы (инбредные линии LH198 или LH244), содержащие незрелые зародыши или каллус, для трансформации изолировали, после чего ДНК-конструкцию, составляющую предмет настоящего изобретения, встраивали в геном кукурузы при помощи агробактерий (см., например, патенты США № 5635055, 5824877, 5591616, 5981840 и 6384301, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Агробактерии, трансформированные ДНК-

конструкциями, перечисленными в таблице 1, инокулировали на ткань кукурузы.

После экспонирования ткани трансформированными бактериями для размножения и селекции трансформированных клеток кукурузы использовали стандартные протоколы трансформации с использованием среды с глифосатным гербицидом.

После селекции клеток, выживших в присутствии глифосатного гербицида, трансгенные растения R_0 регенерировали и выращивали до зрелости. Семена собирали с плодородных трансгенных растений после самооплодотворения или ауткроссинга с другим кукурузным растением. Трансгенные вставки определяли с помощью молекулярного анализа. Для идентификации трансгенных продуктов, содержащих единичную интактную вставку ДНК-конструкции, или для анализа зиготности использовали ПЦР, Саузерн-блот-анализ, Taqman®-анализ или другие методики, известные специалистам в области молекулярной биологии. Полученное зерновое потомство высаживали и полученные из них растения выращивали для последующего анализа содержания лизина в тканях и семенах потомства.

Пример 2

Определение содержания лизина в тканях и семенах кукурузы

Различные способы являются полезными для определения содержания лизина в тканях растений, их зернах и процессированных продуктах, например, в настоящем изобретении для анализа содержания свободного лизина (в частях на миллион, ppm) в зернах кукурузы, соответствующих различным трансгенным продуктам, идентифицированным как трансформированные при помощи ДНК-конструкции, описанной в таблице 1, использовалась жидкостная хроматография-масс-спектрофотометрия/масс-спектрофотометрия (LC-MS-MS); результаты данного анализа приведены в таблицах 1 и 2. Пробы индивидуальных зрелых кукурузных зерен, соответствующих каждому из трансгенных продуктов, сначала взвешивали, затем перемалывали в тонкий гомогенный порошок, который далее экстрагировали при помощи растворителя, состоящего из метанола, воды и муравьиной кислоты. В случае «bulked»-зерна использовали примерно 30 мг измельченного порошка. Для выделения лизина из экстракта применяли жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию с мониторингом множественных реакций (MRM). После отделения количество лизина вычисляли по площади масс-спектрометрического пика относительно калибровочной кривой, которая была получена с использованием дейтерированного d_4 -лизина в качестве внутреннего стандарта (IS).

В другом случае определение содержания лизина в зернах кукурузы было основано на определении свободных аминокислот при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Отдельные зерна или зерновые пулы каждого из трансгенных продуктов перемалывали в тонкий гомогенный порошок согласно ранее описанному и в данном случае для анализа использовали примерно 30 мг данного порошка. Экстракцию аминокислот проводили при помощи 5% трихлоруксусной кислоты, определение аминокислот проводили при помощи предколонной первичной аминной дериватизации с использованием о-фталальдегида (OPA). При проведении хроматографии с обращенной фазой разделение происходит благодаря гидрофобности R-групп каждой из аминокислот. Для стабилизации флуорофора добавляется тиол, такой как 2-меркаптоэтанол ($\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) или 3-меркаптопропионовая кислота ($\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).

Уровень свободного лизина (в частях на миллион, ppm) в трансгенных продуктах, полученных в ходе трансформации каждой из конструкций, были усреднены и обобщены в таблице 1. Также приведены поколения (F1, F2, F3 и F4)

проанализированных зерен. Результаты измерения содержания свободного лизина в зернах поколения R1 трансгенных кукурузных продуктов, содержащих рMON80378, приведены в таблице 2. Содержание лизина было неожиданно высоким в проанализированных продуктах 5 и 6. Содержание лизина может быть далее
5 отрегулировано путем скрещивания кукурузных продуктов, содержащих различные комбинации кассет, предназначенных для экспрессии в растениях и описанных в таблице 1, таких, что гибридное зерно, полученное от скрещивания родительских растений, содержащих одну или более экспрессионных кассет, будет содержать
10 желаемое количество лизина. Инбредное родительское растение, содержащее, например, экспрессионные кассеты *CordapA* и *lysC E.coli* (дикий тип или *Ec.lysC.mut*, SEQ ID NO:11, молекула ДНК, кодирующая белок, модифицированный в четырех позициях - S2A, C58G, T352I и A401G), может быть скрещено с другим родительским растением, содержащим экспрессионную кассету дцРНК LKR, в результате чего
15 получаемое зерновое потомство содержит большее количество лизина, нежели суммарное содержание лизина в обоих родительских растениях. Родительское растение, содержащее другие комбинации, такие как, например, комбинация *CordapA* и дцРНК LKR, может быть скрещено с другим родительским растением,
20 содержащим *LysC*, или же родительское растение, содержащее *LysC* и дцРНК LKR, может быть скрещено с другим родительским растением, содержащим *CordapA*, для получения неожиданно высокого содержания лизина в гибридных зернах.

25

30

35

40

45

50

Таблица 1

Содержание лизина (в частях на миллион, ppm) в расчете на поколение по данным тепличного анализа, а также различных полевых тестов

| Генотип | F1 | F2 (R1) | F3 (R2) | F4 (R3) |
|---|---------|----------|----------|----------|
| 1. pMON65178: P-Zm.seed/I-Os.Act1/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR | | | | |
| LH198/HiII | - | 1720 ppm | 1825 ppm | 2133 ppm |
| 2. pMON66568: P-CI.Gcx/I-Os.Act1/Zm.LKR antisense/T-3'UTR | | | | |
| LH198/HiII | - | 31 ppm | 56 ppm | - |
| 3. pMON66646: P-CI.Gcx/I-Os.Act1/Zm.LKR- дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| LH198/HiII | | 1279 ppm | 1893 ppm | 2575 ppm |
| 4. pMON66649: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR > <P-CI.Gcx/ I-Os.Act1/Zm.LKR- дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| LH198/HiII | - | 1871 ppm | 4556 ppm | - |
| 5. pMON79454: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /3'UTR | | | | |
| LH244 | 862 ppm | 1274 ppm | 3084 ppm | - |
| 6. pMON80002: P-Zm.seed/I-Zm.Adh1/Zm.LKR- дцPHK/ T-3'UTR | | | | |
| LH244 | 38 ppm | 147 ppm | 330 ppm | - |

| | | | | | |
|----|--|----------|----------|----------|---|
| | 7. pMON80003: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR> <P-Zm.seed/I-Zm.Adh1/Zm.LKR дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 1660 ppm | 2223 ppm | 4213 ppm | - |
| 5 | 8. pMON80000: P-L3/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | - | 1157 ppm | 2560 ppm | - |
| | 9. pMON80001: P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 22 ppm | 44 ppm | - | - |
| | 10. PMON80354: P-Cl.Gcx/I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno / T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 27 ppm | 47 ppm | - | - |
| 10 | 11. PMON80355: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T- 3'UTR | | | | |
| | LH244 | 930 ppm | 2065 ppm | - | - |
| | 12. PMON79901: P-Zm.Em/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-Ps.RbcS2:B9> <P-Zm.L3/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 1385 ppm | 3685 ppm | - | - |
| 15 | 13. PMON79900: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /3'UTR <<P-Zm.Em/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/3'UTR | | | | |
| | LH244 | 2150 ppm | 3688 ppm | - | - |
| | 14. PMON79464: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 159 ppm | 720 ppm | 567 ppm | - |
| 20 | 15. PMON79465: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/ внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK/T-3'UTR> <P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | 1470 ppm | 3171 ppm | 4158 ppm | - |
| | 16. PMON74130: P-Cl.Gcx/I-Os.Act1/LKR- дцPHK/ T-3'UTR> <PZm.B32/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR | | | | |
| 25 | LH244 | - | 3443 ppm | | |
| | 17. pMON80371: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-3'UTR><P-Zm.Gcx/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | - | - | | |
| 30 | 18. pMON80374:P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1/Ec.lysC/3'UTR><P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-Ta.hsp17 | | | | |
| | LH244 | - | - | | |
| | 19. pMON80378: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /Ec.lysC/3'UTR >>P-Zm.Gcx/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR > <P-Zm.seed/ внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| 35 | LH244 | - | 8974 ppm | - | |
| | 20. pMON93072: P-Zm.B32/ внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK, встроенный в интрон I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR><P-Zm.Gcx/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-3'UTR | | | | |
| 40 | LH244 | | | | |
| | 21. pMON93073:P-Cl.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR><P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | - | | | |
| 45 | 22. pMON93066: P-B32/внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK, встроенный в интрон I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno)/ T-3'UTR | | | | |

50

| | | | | | |
|----|--|---|----------|----------|---|
| | LH244 | - | 3648 ppm | - | |
| | 23. pMON93067: P-B32/внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK, встроенный в интрон I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR | | | | |
| 5 | LH244 | | | | |
| | 24. pMON93063: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1 /внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK /T-3'UTR > <P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | | | | |
| 10 | 25. pMON93064: P-Zm.Em/ I-Zm.Adh1 /Ec.lysC/3'UTR > <P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno)/ T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | | | | |
| | 26. pMON80370: P-Zm.L3/внутренний фрагмент Zm.LKR дцPHK, встроенный в интрон I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-3'UTR | | | | |
| 15 | LH244 | - | 645 ppm | - | |
| | 27. pMON79469: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /Zm.LKR- дцPHK/ 3'UTR><P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-Zm.DHDPS/ T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | - | 182 ppm | - | - |
| 20 | 28. pMON79470: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /внутренний фрагмент Zm.LKR /3'UTR><P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-DHDPS/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | - | 368 ppm | - | - |
| | 29. pMON93065:P-Zm.seed/ I-Zm.Adh1/внутренний фрагмент Zm.LKR /3'UTR><P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR | | | | |
| 25 | LH244 | | | | |
| | 30. pMON93092: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hsp17><P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR дцPHK bfx/T-3'UTR | | | | |
| | LH244 | | | 4478 ppm | |
| 30 | 31. pMON93093: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK-LKR дцPHK bfx -I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hsp17 | | | | |
| | LH244 | | | 3041 ppm | |
| | 32. pMON93083: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA- CORgl.dapA.nno /T-Ta.Hsp17, P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR дцPHK bfx/T-3'UTR> | | | | |
| 35 | LH244 | | | | |
| | 33. pMON93084: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hsp17, P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR дцPHK bfx)/T-3'UTR> | | | | |
| | LH244 | | | | |
| 40 | 34. pMON80380: RB <P-CI.Gcx/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-Ps.RbcS2:E9><P- Zm.B32/I-Zm.DnaK-Zm.LKR дцPHK- Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.hHsp17> | | | | |
| | LH244 | | | | |
| | 35. pMON74138: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK-Zm.LKR дцPHK- Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno / TS-Zm.DapA-Ec.lysC/T-Ta.Hsp17> | | | | |
| 45 | LH244 | | | | |

50

| | |
|--|------------------------------------|
| Таблица 2 | |
| Содержание лизина в трансгенных продуктах R1, трансформированных pMON80378 | |
| Кукурузный продукт | Содержание свободного лизина (ppm) |
| Zm_M118682 | 16379 |

| | |
|------------|-------|
| Zm_M118685 | 15092 |
| Zm_M118686 | 17878 |
| Zm_M118699 | 18815 |
| Zm_M118700 | 22719 |
| Zm_M118702 | 1832 |

5

Содержание свободного лизина в зернах трансгенных продуктов, содержащих рMON93092, также было измерено при помощи тандемной масс-спектрофотометрии (LC-MS-MS) в измельченных и экстрагированных пробах, примерно по 20 зерен в каждой лунке. Содержание свободного лизина в частях на миллион (ppm) в зернах поколения R2 из ряда трансформированных продуктов продемонстрировано на фиг.7 и 8. Как показано для продуктов, содержащих рMON93092, содержание свободного лизина составляло примерно 3500-5500 ppm, тогда как для продуктов, содержащих рMON93093, содержание свободного лизина составляло примерно 1700-6500 ppm. В большинстве случаев были проведены независимые измерения в двух или более лунках, соответствующих одному и тому же продукту; на фигурах также продемонстрированы значения стандартного отклонения. Для сравнения, содержание лизина в кукурузе дикого типа составляет от 50 до 100 ppm.

10

15

20

25

Раскрытые выше и процитированные в формуле изобретения плазмиды рMON93092 и рMON93093 были депонированы Monsanto Technology LLC по Будапештскому соглашению с Американской коллекцией типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. Номера ATCC - РТА-6733 и РТА-6734 соответственно. Депозит будет храниться в депозитарии в течение 30 лет, либо в течение 5 лет после последнего запроса, либо в течение срока эффе́ктивного использования патента - в зависимости от того, какой срок окажется дольше, и будет при необходимости заменен в течение этого периода.

30

Все публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и индивидуально включена посредством ссылки.

ССЫЛКИ

35

Ссылки, приведенные ниже, включены в настоящее описание посредством ссылки в такой степени, чтобы дополнить, объяснить, раскрыть основу или описать методологию, технологию и/или композиции, использованные в контексте настоящего изобретения.

40

45

50

Патент США № 4810648; патент США № 4957748; патент США № 4959317; патент США № 5015580; патент США № 5034322; патент США № 5094945; патент США № 5100679; патент США № 5107065; патент США № 5188642; патент США № 5219596; патент США № 5258300; патент США № 5288300; патент США № 5322938; патент США № 5352605; патент США № 5359142; патент США № 5362865; патент США № 5367110; патент США № 5527695; патент США № 5530196; патент США № 5538880; патент США № 5550318; патент США № 5591616; патент США № 5627061; патент США № 5633435; патент США № 5635055; патент США № 5641876; патент США № 5759829; патент США № 5773691; патент США № 5780708; патент США № 5824877; патент США № 5837848; патент США № 5936069; патент США № 5981840; патент США № 6005076; патент США № 6040497; патент США № 6107549; патент США № 6118047; патент США № 6140078; патент США № 6146669; патент США № 6156227; патент США № 6160208; патент США № 6175060; патент США № 6177611; патент США № 6232526; патент США № 6252138; патент США № 6294714; патент США № 6376754; патент США № 6384301; патент США № 6399861; патент США № 6403865;

патент США № 6426446; патент США № 6429357; патент США № 6429362; патент США № 6433252; патент США № 6437217; патент США № 6459019; патент США № 6635806; патент США № 6660911.

Патентная заявка США № 2002/0112260; патентная заявка США № 2003/0056242;
 5 патентная заявка США № 2003/0106096; патентная заявка США № 2003/0140364;
 патентная заявка США № 20030196219; патентная заявка США № 2005/0132437;
 патентная заявка США № 2005/0193444.

Патентная заявка США с серийным № 09/757089.

10 Bonnassie с соавторами, *Nucleic Acids Res.*, 18: 6421, 1990.

DeBlock с соавторами, *EMBO J.*, 6: 2513-2519, 1987.

della-Cioppa с соавторами, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6873-6877, 1986.

Fraley с соавторами, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807, 1983.

Klee с соавторами, *Mol. Gen. Genet.*, 210: 437-442, 1987.

15 Misawa с соавторами, *Plant J.*, 4: 833-840, 1993.

Misawa с соавторами, *Plant J.*, 6: 481-489, 1994.

Padgett с соавторами, In: *Herbicide Resistant Crops*, Lewis Publishers, 53-85, 1996.

PCT заявка WO 0011200A2.

20 Penaloza-Vazquez с соавторами, *Plant Cell Reports*, 14: 482-487, 1995.

Redenbaugh с соавторами, In: *Safety Assessment of Genetically Engineered Flavr SavrTM Tomato*, CRC Press, Inc., 1992.

Richaud с соавторами, *J. Bacteriol.*, 166: 297-300, 1986.

25 Sambrook с соавторами, In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000.

Sathasiivan с соавторами, *Nucl. Acids Res.*, 18: 2188-2193, 1990.

Turner and Foster, *Molec. Biotech.*, 3: 225, 1995.

30 Формула изобретения

1. Семя трансгенной кукурузы, содержащее более чем 4000 частей на миллион (ppm) свободного лизина, где семя кукурузы содержит нативную ДНК и одну или несколько экзогенных кассет для экспрессии в растениях, содержащих молекулу ДНК,
 35 кодирующую дигидродипиколинатсинтазу, в значительной степени устойчивую к ингибированию свободным L-лизинном по принципу обратной связи, молекулу ДНК, транскрибируемую с получением молекулы РНК, подавляющей лизинкетоглутаратредуктазу/сахаропиндегидрогеназу, и молекулу ДНК, кодирующую аспартаткиназу, в значительной степени устойчивую к действию лизин-
 40 опосредованной обратной связи; где молекулы ДНК функционально связаны с одной или несколькими промоторными молекулами таким образом, что происходит транскрипция одной или нескольких молекул РНК в основном в эндосперме кукурузного семени, где, необязательно, семя кукурузы содержит экзогенный ген, придающий устойчивость к гербицидам.

45 2. Кукурузная мука, полученная из семени кукурузы по п.1, в которую не добавлен лизин.

3. Семя трансгенной кукурузы по п.1, которое содержит экзогенный ген, придающий устойчивость к гербицидам.

50 4. Семя трансгенной кукурузы по п.3, которое является устойчивым к гербициду глифосат.

5. Применение семени трансгенной кукурузы по п.1 для получения корма.

6. Применение семени трансгенной кукурузы по п.1 для получения муки грубого

или тонкого помола.

7. Применение семени трансгенной кукурузы по п.1 для получения белкового концентрата или изолята.

5 8. Способ получения кукурузной муки, включающий получение семени трансгенной кукурузы, имеющего содержание лизина по меньшей мере 4000 частей на миллион (ppm), где семя кукурузы содержит нативную ДНК и одну или несколько экзогенных кассет для экспрессии в растениях, содержащих молекулу ДНК, кодирующую дигидродипиколинатсинтазу, в значительной степени устойчивую к ингибированию свободным L-лизинном по принципу обратной связи, молекулу ДНК, транскрибируемую с получением молекулы РНК, подавляющей лизинкетоглутаратредуктазу/сахаропиндегидрогеназу, и молекулу ДНК, кодирующую аспартаткиназу, в значительной степени устойчивую к действию лизин-опосредованной обратной связи; где молекулы ДНК функционально связаны с одной или несколькими промоторными молекулами таким образом, что происходит транскрипция одной или нескольких молекул РНК в основном в эндосперме кукурузного семени, где, необязательно, семя кукурузы содержит экзогенный ген, придающий устойчивость к гербицидам, без добавления лизина, и переработку семени кукурузы с получением кукурузной муки.

15 9. Способ по п.8, где указанное семя трансгенной кукурузы содержит экзогенный ген, придающий устойчивость к гербицидам.

10. Способ по п.9, где семя трансгенной кукурузы является устойчивым к гербициду глифосат.

25 11. Применение семени трансгенной кукурузы по п.1 для употребления человеком или животным.

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MALVAR, THOMAS M.
 HUANG, SHIHSHIEH
 LUETHY, MICHAEL H.

<120> СЕМЕНА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИЗИНА

<130> MONS:094US

<140> UNKNOWN
 <141> 2006-09-22

<150> 60/723,178
 <151> 2005-10-03

<160> 11

<210> 1
 <211> 903
 <212> ДНК
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

agtacaggtt taacagctaa gaccggagta gagcacttcg gcaccgttgg agtagcaatg
 60

gttactccat tcacggaatc cggagacatc gatatcgctg ctggccgcga agtcgaggct
 120

tatttggttg ataagggtt ggattctttg gttctcggg gcaccactgg tgaatcccca
 180

acgacaaccg ccgctgaaaa actagaactg ctcaaggccg ttcgtgagga agttggggat
 240

ggggcgaagc tcatcgccgg tgtcggaaac aacaacacgc ggacatctgt ggaacttgcg
 300

gaagctgctg cttctgctgg cgcagacggc cttttagttg taactcotta ttactccaag
 360

ccgagccaag agggattgct ggcgcacttc ggtgcaattg ctgcagcaac agaggttcca
 420

atrtgtctct atgacattcc tggtcggcca ggtattccaa ttgagtctga taccatgaga
 480

cgcctgagtg aattacctac gattttggcg gtcaaggacg ccaagggtga cctcgttgca
 540

gccacgtcat tgatcaaaga aacgggactt gcctgggtatt caggcgatga cccactaaac
 600

cttgtttggc ttgctttggg cggatcaggt ttcatttcog taattggaca tgcagcccc
 660

acagcattac gtgagttgta cacaaagcttc gaggaaggcg acctcgtccg tgcgcgggaa
 720

atcaacgcca aactatcacc gctggtagct gcccaaggtc gcttgggtgg agtcagcttg
780

gcaaaagctg cttcgcgtct gcagggcatc aacgtaggag atcctcgact tccaattatg
840

gctccaaatg agcaggaact tgaggctctc cgagaagaca tgaaaaaago tggagttcta
900

taa
903

<210> 2
<211> 3183
<212> ДНК
<213> Zea mays

<400> 2

atgggttctg ctgctactga gggcaatgac accttgctgg gcaatggagt tgttgggatt
60

cttgctgaga cttgtaatat gtgggaaaga agggcgccgt taactccttc ccattgtgcc
120

cgcttctgc taggaggagg caagaacgga cctcgagtaa accggattat tgtgcagcca
180

agcacaagga ggatccatca tgacgctcag tatgaggatg caggatgcga gatttcagaa
240

gacctgtcag aatgcggcct tatcataggc atcaaacac ccaagctgca gatgattctt
300

tcagatagag cgtacgcttt cttttcacac acacacaaag cccaaaaaga gaatatgcca
360

ctgttagaca agatccttga agaaagggtg tccttgtttg attatgagct aattgttggg
420

gatgatggga aaagatcact agcatttggg aaatttgotg gtagagctgg actgatagat
480

ttcttacatg gtctcggaca gcgatatttg agccttggat actcgactcc atttctctct
540

ctgggacaat ctcatatgta tccttcgctc gctgcagcca aggctgcagt cattgtcgtt
600

gcagaagaga tagcaacatt tggacttcca tccggaattt gtccgatagt gtttgtgttc
660

actggagttg gaaacgtctc tcagggtgcg caggagatat tcaagttatt gcccatacc
720

ttgttgatg ctgagaagct tcccgaatt tttcaggcca ggaatctgtc taagcaatct
780

cagtcgacca agagagtatt tcaactttat ggttgtgttg tgacctctag agacatggtt
840

tctcacaagg atcccaccag acaatttgac aaaggtgact attatgctca tccagaacac
900

tacacccctg tttttcatga aagaattgct ccatatgcat ctgtcatcgt aaactgtatg
960

tattgggaga agaggtttcc accattacta aatattggatc agttacagca attgatggag
1020

actggttgtc ctttagtcgg cgtttgtgac ataacttgtg atattggagg ttccattgaa
1080

tttatcaaca agagtacatc aatagagagg cctttctttc ggtatgatcc ttctaagaat
1140

tcataccatg atgatatgga aggtgcogga gtggtctgct tggetgttga cattctocct
1200

acagaattct ctaaagaggc ctccaacat tttggaaaca tactatctag acttgttget
1260

agtttggcct cagtgaagca accggcagaa cttccttcct acttgagaag agcttgcatt
1320

gcacatgctg gcagattaac tcctttgtat gaatatatcc ctaggatgag aaatactatg
1380

atagatttgg caccogcaaa aacaaatcca ttgcctgaca agaagtatag caccctggta
1440

tctctcagtg ggcacctatt tgataagttc cttataaatg aagctttgga catcattgag
1500

acagetggag gttcatttca cttgggttaga tgtgaagttg gacaaagcac ggatgatatg
1560

tcatactcag agcttgaagt aggagcagat gatactgcca cattggataa aattattgat
1620

tccttgactt ctttagctaa tgaacatggt ggagatcacg atgccgggca agaaattgaa
1680

ttagctctga agataggaaa agtcaatgag tatgaaactg acgtcacaat tgataaagga
1740

gggccaaaga ttttaattct tggagctgga agagtctgtc ggccagctgc tgagtttctg
1800

gcactcttacc cagacatatg tacctatggt gttgatgacc atgatgcaga tcaaattcat
1860

gttatcgtgg catctttgta tcaaaaagat gcagaagaga cagttgatgg tattgaaaat
1920

acaactgcta cccagcttga tgttgctgat attggaagcc tttcagatct tgtttctcag
1980

gttgaggttg taattagctt gctgcctgct agttttcatg ctgccattgc aggagtatgc
2040

atagagttga agaagcacat ggtaacggca agctatggtg atgaatccat gtcaaacttg
2100

agccaagctg ccaaagatgc aggtgtaact atactttgtg aaatgggcoct agatcctggc
2160

atagatcact tgatgtcaat gaagatgatt gatgaagctc atgcacgaaa gggaaaaata
2220

aaggcattta catcttactg tgggtgattg ccatctccag ctgcagcaaa caatccgctt
2280

gcctataaat tcagttggaa cccagctggg gcactccggg cagggaaaaa tctgcagtc
2340

tacaaatttc ttggtgagac gatccatgta gatggtcata acttgatga atcagcaaag
2400

aggctcagac tacgagagct tccagctttt gctctggaac acttgccaaa tcggaattcc
2460

ttgatatatg gtgacctta tggatctcc aaagaagcat ccaccatata tagggctact
2520

cttcgttacg aaggttttag tgagattatg gtaacccttt ccaaaactgg gttctttgat
2580

gctgcaaate atccactgct gcaagatact agtcgtccaa catataaggg tttccttgat
2640

gaactactga ataatatctc cacaattaac acggacttag atattgaagc ctctggtgga
2700

tacgatgatg acctgattgc cagactggtg aagctcgggt gttgcaaaaa taaggaaata
2760

gctgttaaga cagtcaaaac catcaagttc ttgggactac atgaagagac tcaaatacct
2820

aagggttgtt cgagcccatt tgatgtgatt tgccagcgaa tggaacagag gatggcctat
2880

ggccacaatg agcaagacat ggtactgctc caccacgaag tcgaggtgga ataccoggac
2940

gggcaaccgc ccgaaaagca ccaagcgagc ctactggagt tcgggaaggt tgaaaatggc
3000

aggccacca ctgccatggc gctgaccgtc ggcattccag cagcaatagg ggccctgcta
3060

ttgctaaaga ataaggtcca gacgaaagga gtgatcaggc ctctgcaacc ggaaatctac
3120

gttcagcat tggagatctt ggagtcgtcg ggcacaaagc tgggtgagaa agtggagact
3180

tga
3183

<210> 3
 <211> 1350
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 3

atggcagaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg
 60

aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct
 120

tctgctggta tcaactaatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga
 180

ttcgaaaaac tgcagcctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac
 240

ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa
 300

gctggcggcg tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg
 360

atgtcgaccg tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtggttt
 420

gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgattttggc gtgcagagcc agatatagcc
 480

gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc
 540

accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc
 600

agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg
 660

accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt
 720

gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat
 780

ccggcaacgt tgctaaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa
 840

gaccacgcg caggtggtac gctgggtgtc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc
 900

gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcactttgc acagcctgaa tatgctgcat
 960

tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac
 1020

ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaatccttg ataccaccgg ttcaacctcc
 1080

actggcgata cgttggtgac gcaatctctg ctgatggage tttccgcaact gtgtcgggtg
1140

gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgog ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc
1200

ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat
1260

ggcgcaccca gccataacct gtgcttcctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtgggtg
1320

caaaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa
1350

- <210> 4
- <211> 392
- <212> ДНК
- <213> Zea mays
- <400> 4

gatctcgtca atttttccct tttgtaattt tgtaatttat aatttacttt cctgtatgct
60

tctaactctg tcgtttttaa attttaataa aatttcagta ggggcttgcc cctcctgtcc
120

tataaaaaaaaa agttgacgtg aatagatttc attaagaggt tggatggttag tgggatgaca
180

tgactattag taggacgaga tgatgtggaa agttagtggg agatgatatg gatagttttt
240

gctttcatcg aaaggttgga agttagtatg atgacatggc taatatagat acatagatat
300

agactaccaa catggctgca tgcccccaag ctctcccact atatatatct ctggtagcac
360

atcatcccaa ttcacaatgc ttacaaaaac cc
392

- <210> 5
- <211> 903
- <212> ДНК
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <400> 5

ttatagaact ccagcttttt tcatgtcttc tgcagagcc tcaagttcct gctcatttgg
60

agccattatt ggaagcctag gatctcctac gttgatgact tgcagacgca gaggagcttt
120

tgccaagctg actccacca agcgacctg ggcagctacc agcggtgata gtttggcgtt
180

gatctccctc gcacggacca ggtcgcttc ctcgaaactt gtgtacaact cccttaatgc
240

tgtgggggct gcatgtccaa ttacggatat aaaacctgat cgcgccaaag caagccaaac
300

aaggtttagt gggtcacgc ctgaatacca ggcaagtccc gtttctttga tcaatgacgt
360

ggctgcaacc aggtcccctt tggcgtcttt gaccgcaaaa atcgtaggta attcactcag
420

gcgtctcatg gtatcagact caattggaat acctgacctt ccaggaatgt cgtagaggca
480

aattggcacc tctgttgctg ctgcgattgc cccgaagtgc gccagcaatc cctcctggct
540

cggttactg taataaggag ttacgactaa aaggccgtct gcgccagcag aagcagcagc
600

ctccgcaagt tccacagatg tccgcgtggt attggttccg acaccggcga ttagtttcgc
660

cctatcccct acttcctcac gcacggcctt gagcagttct agtttctcag cggcggttgt
720

cgttggggat tcaccagtgg tgcccgcgag caccaaagaa tccaagcctt tatcgactag
780

ataagccgcg acctcgcggc cagcagctat atcgatgtct ccactttccg tgaatggagt
840

taccattgct actcccacgg tgccaaagtg ctctactccg gtcttagctg ttaaacctgt
900

gct
903

- <210> 6
- <211> 171
- <212> ДНК
- <213> Zea mays

<400> 6

atggtttcgc cgacgaatct cctcccggcg cggaagatca cccctgtctc aaatggcggc
60

gcagcgacgg cgagcccctc ttctccctcg gtggccgcac ggccacggcg actcccttca
120

ggcctccaat ctgtgactgg tagaggggaag gtttccttgg cagccatcac t
171

- <210> 7
- <211> 300
- <212> Белок
- <213> Escherichia coli

<400>

7

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

<210> 8
 <211> 449
 <212> Benok
 <213> Escherichia coli

<400> 8

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

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Ala Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 9
 <211> 1155
 <212> ДНК
 <213> Zea mays

<400> 9

ccgatttggc aagtgttcca gagcaaaagc tggaagctct cgtagtctga gcctctttgc
 60

tgattcatac aagttatgac catctacatg gatcgtctca ccaagaaatt tgtagactgc
 120

aggatttttc cctgaccgga gtgcaccagc tgggttccaa ctgaatttat aggcaagcgg
 180

attgtttgct gcagctggag atggcaatcc accacagtaa gatgtaaagt cctttatttt
 240

tccttttctg gcatgagctt catcaatcat cttcattgac atcaagtgat ctatgccagg
 300

atctaggccc atttcacaaa gtatagttac acctgcatct ttggcagctt ggctcaagtt
 360

tgacatggat tcatcaacat agcttgccgt taccatgtgc ttcttcaact ctatgcatac

420

tcttgcaatg gcagcatgaa aactagcagg cagcaagcta attacaacct caacctgaga
480

aacaagatct gaaaggcttc caatattcagc aacatcaagc tgggtagcag ttgtattttc
540

aataccatca actgtctctt ctgcatcttt ttgatacaaa gatgccacga taacatgaat
600

ttgatctgca tcatggatcat caacaccata ggtacatatg tctgggtaag atgccagaaa
660

ctcagcagct ggccgacaga ctcttccagc tccaaaccgg tgctgcctgc tagttttcat
720

gctgccattg caggagtatg catagagttg aagaagcaca tggtaaccgg aagctatggt
780

gatgaatcca tgtcaaaactt gagccaagct gccaaagatg cagggtgtaac tatactttgt
840

gaaatggggc tagatcctgg catagatcac ttgatgtcaa tgaagatgat tgatgaagct
900

catgcacgaa agggaaaaat aaaggcattt acatcttact gtgggtgatt gccatctcca
960

gctgcagcaa acaatccgct tgcctataaa ttcagttgga acccagctgg tgcactccgg
1020

tcagggaaaa atcctgcagt ctacaaattt cttgggtgaga cgatccatgt agatggatcat
1080

aacttgatg aatcagcaaa gaggctgaga ctacgagagc ttccagcttt tgcctctgaa
1140

cacttgccaa atcgg
1155

<210> 10

<211> 1967

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерная ДНК-молекула интрона hsr70 маиса (кукурузы) и молекулы, подавляющей ген LKR/SDH

<400> 10

accgtctctg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa
60

tgcctctctg tgtgggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa
120

atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat
180

ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttgggtgct
240

tagcgggtatt tatttaagca catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct
300

gttaatttag gcacaggctt catactacat ggtcaatag tatagggatt catattatag
360

gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc
420

tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaatt tgttgatccc gatttggcaa gtgttccaga
480

gcaaaagctg gaagctctcg tagtctgagc ctctttgctg atccatacaa gttatgacca
540

tctacatgga tcgtctcacc aagaaatttg tagactgcag gatttttccc tgaccggagt
600

gcaccagctg ggttccaact gaatttatag gcaagcggat tgtttgctgc agctggagat
660

ggcaatccac cacagtaaga tgtaaatgcc tttatttttc cctttcgtgc atgagcttca
720

tcaatcatct tcattgacat caagtgatct atgccaggat ctaggcccat ttcacaaagt
780

atagttacac ctgcatcttt ggcagcttgg ctcaagtttg acatggattc atcaacatag
840

cttgccgtta ccatgtgctt cttcaactct atgcatactc ctgcaatggc agcatgaaaa
900

ctagcaggca gcaagctaat tacaacctca acctgagaaa caagatctga aaggcttcca
960

atatcagcaa catcaagctg ggtagcagtt gtattttcaa taccatcaac tgtctcttct
1020

gcatcttttt gatacaaaga tgccacgata acatgaattt gatctgcatc atggtcatca
1080

acaccatagg tacatatgtc tgggtaagat gccagaaact cagcagctgg ccgacagact
1140

cttccagctc caaaccgggtg ctgcctgcta gttttcatgc tgccattgca ggagtatgca
1200

tagagttgaa gaagcacatg gtaacggcaa gctatgttga tgaatccatg tcaaacttga
1260

gccaaagctgc caaagatgca ggtgtaacta tactttgtga aatgggcta gatcctggca
1320

tagatcactt gatgtcaatg aagatgattg atgaagctca tgcacgaaag ggaaaaataa
1380

aggcatttac atcttactgt ggtggattgc catctccagc tgcagcaaac aatccgcttg
1440

cctataaatt cagttggaac ccagctgggtg cactccggtc agggaaaaat cctgcagtct
1500

acaaatctct tggtgagacg atccatgtag atggtcataa cttgtatgaa tcagcaaaga
1560

ggctcagact acgagagctt ccagcttttg ctctggaaca cttgccaaat cggaaattaac
1620

gctgaagga ataaatataa atgacgaaat tttgatgttt atctctgctc ctttattgtg
1680

accataagtc aagatcagat gcacttgttt taaatattgt tgtctgaaga aataagtact
1740

gacagtattt tgatgcattg atctgcttgt ttgttgtaac aaaatttaaa aataaagagt
1800

ttcctttttg ttgctctcct tacctctgga tggatcttag tatctaccaa ctgacactat
1860

attgcttctc tttacatagc tatcttgctc gatgccttct ccttagtggt gaccagtgtt
1920

actcacatag tctttgctca tttcattgta atgcagatac caagcgg
1967

- <210> 11
- <211> 1350
- <212> ДНК
- <213> Escherichia coli

- <400> 11

atggcagaaa ttgttgctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg
60

aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct
120

tctgctggta tcaactatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga
180

ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac
240

ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa
300

gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg
360

atgtcgaccg tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaaacgg atgttcagggc acagtggttt
420

gatgtacgta aagtgatgog taccaacgac cgatttgggc gtgcagagcc agatatagcc
480

gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgate
540

accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc
600

agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg
660

accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt
720

gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat
780

ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatccgg tctttgtcgg ctccagcaaa
840

gaccacgcgg caggtggtac gctggtgtgc aataaaaactg aaaatccgc gctgttccgc
900

gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcactttgc acagcctgaa tatgctgcat
960

tctcgcggtt tctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac
1020

ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaatccttg ataccacgg tccaacctcc
1080

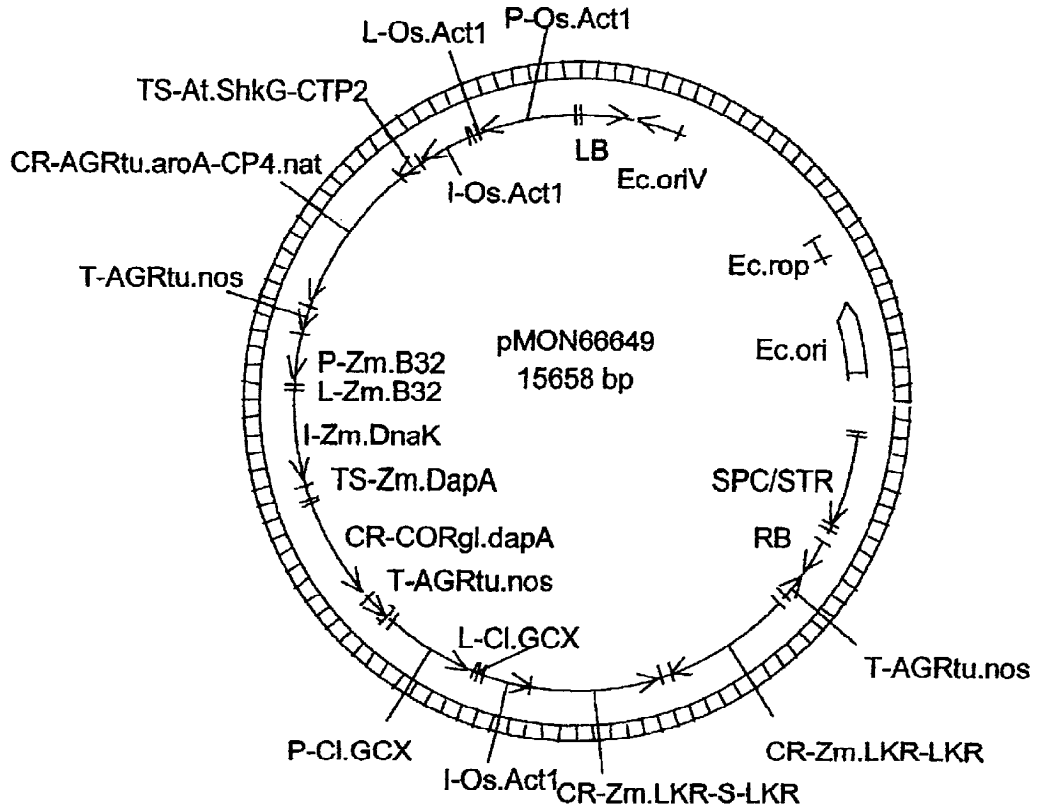
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg
1140

gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc
1200

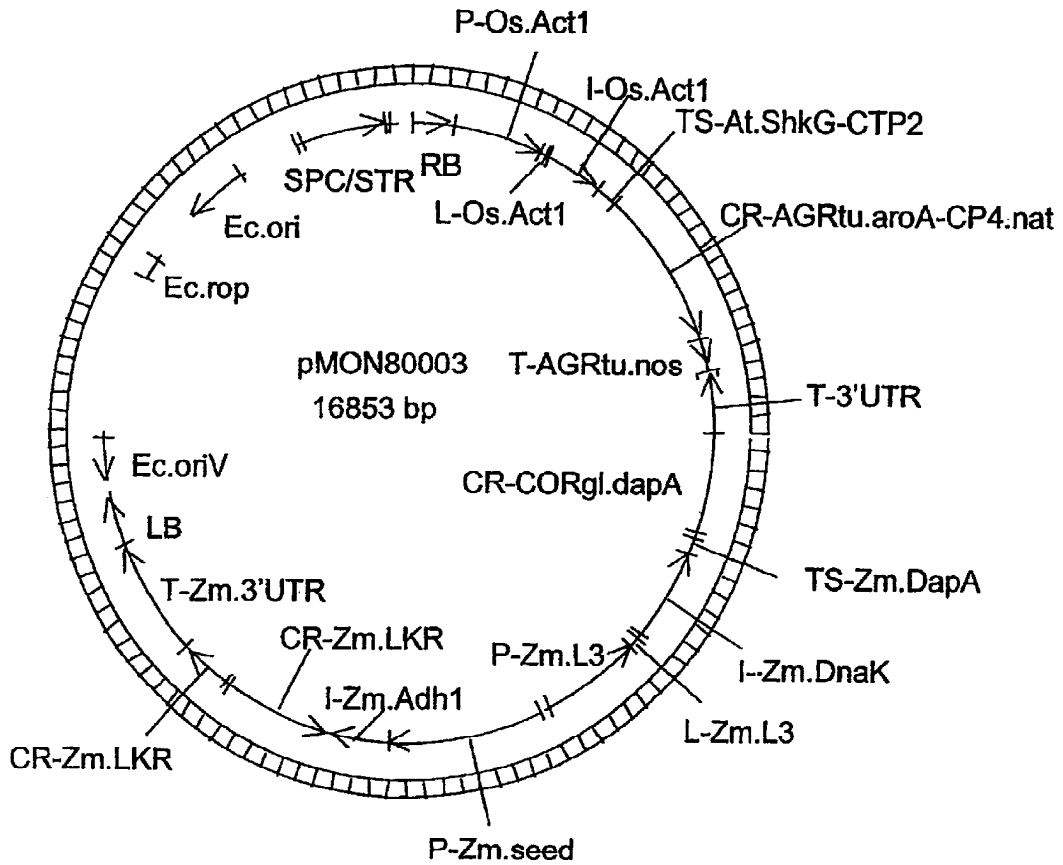
ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat
1260

ggcgcaccca gccataacct gtgcttctctg gtgcccgccg aagatgccga gcaggtgggtg
1320

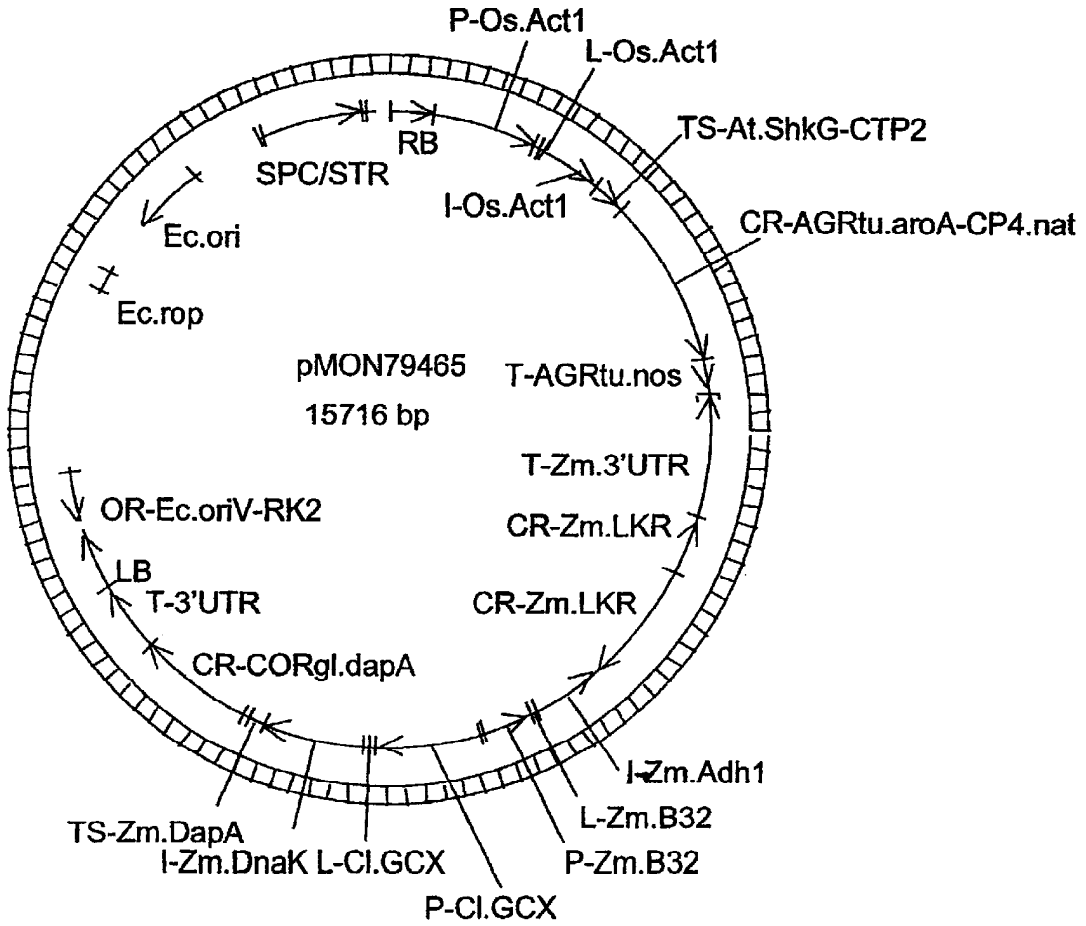
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa
1350



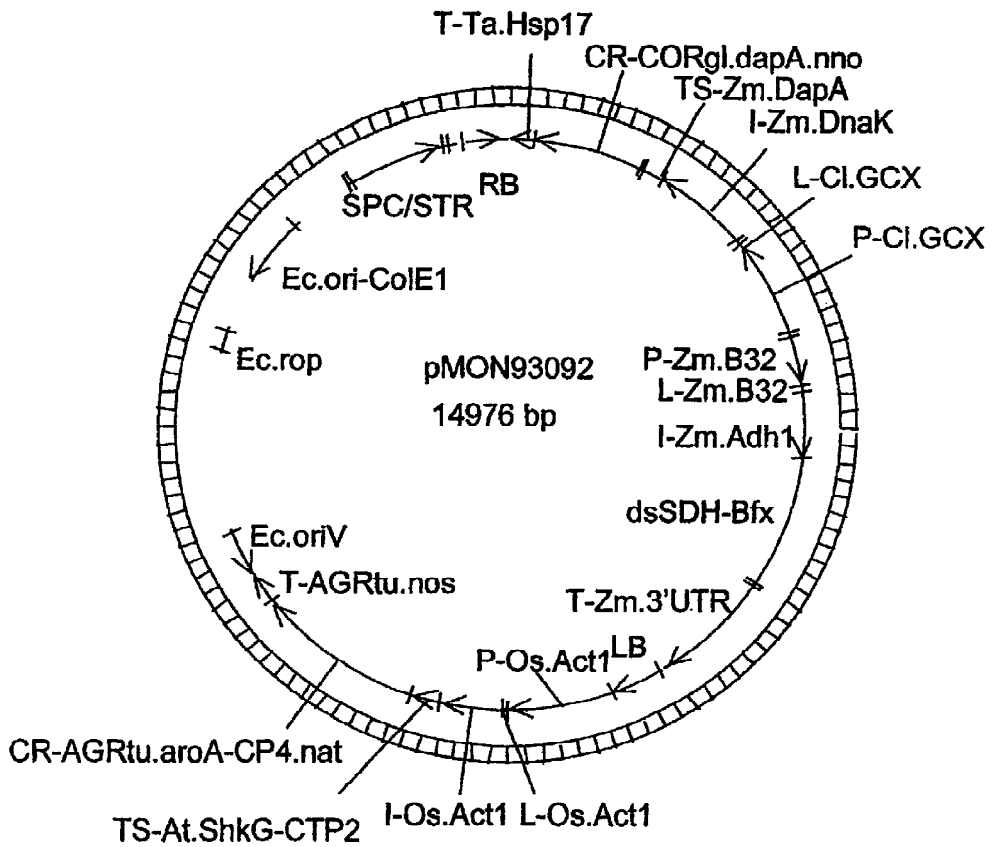
ФИГ.1



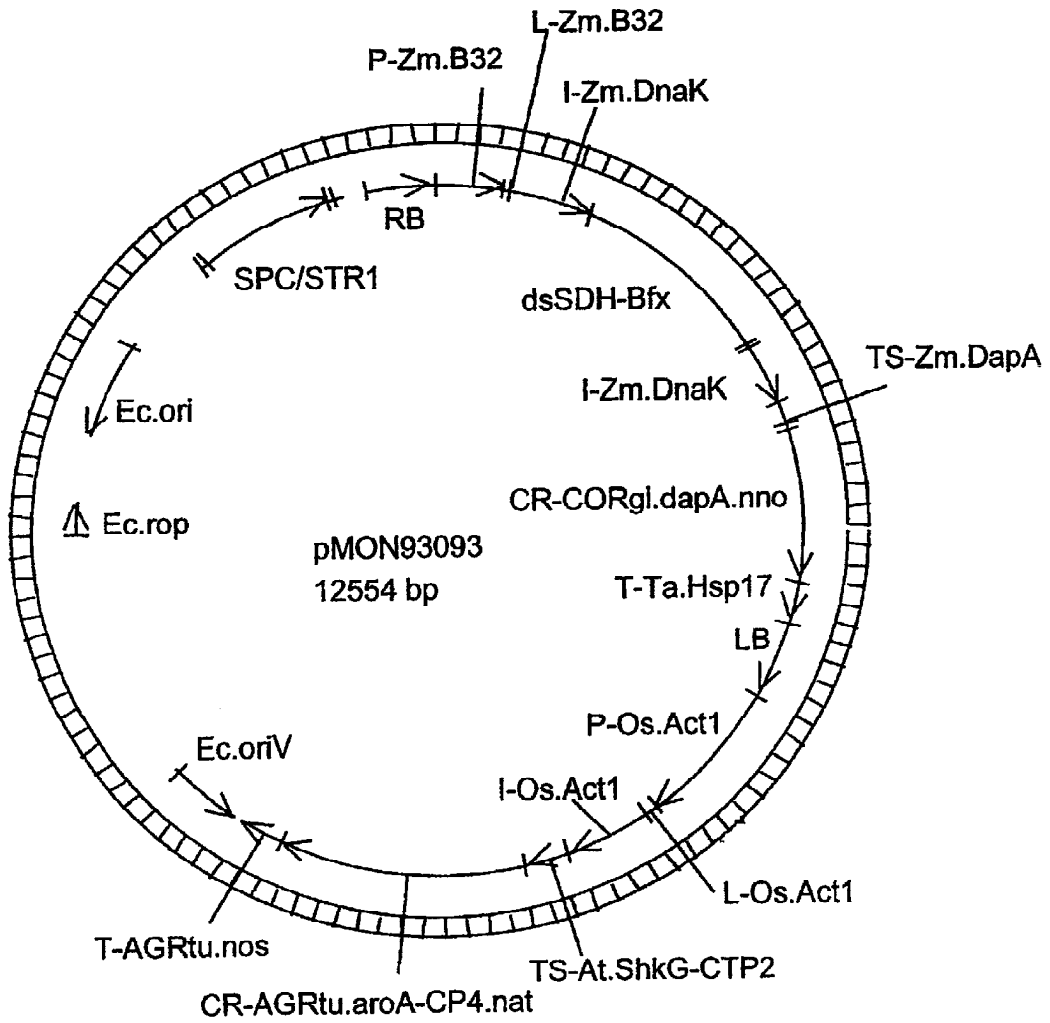
ФИГ.2



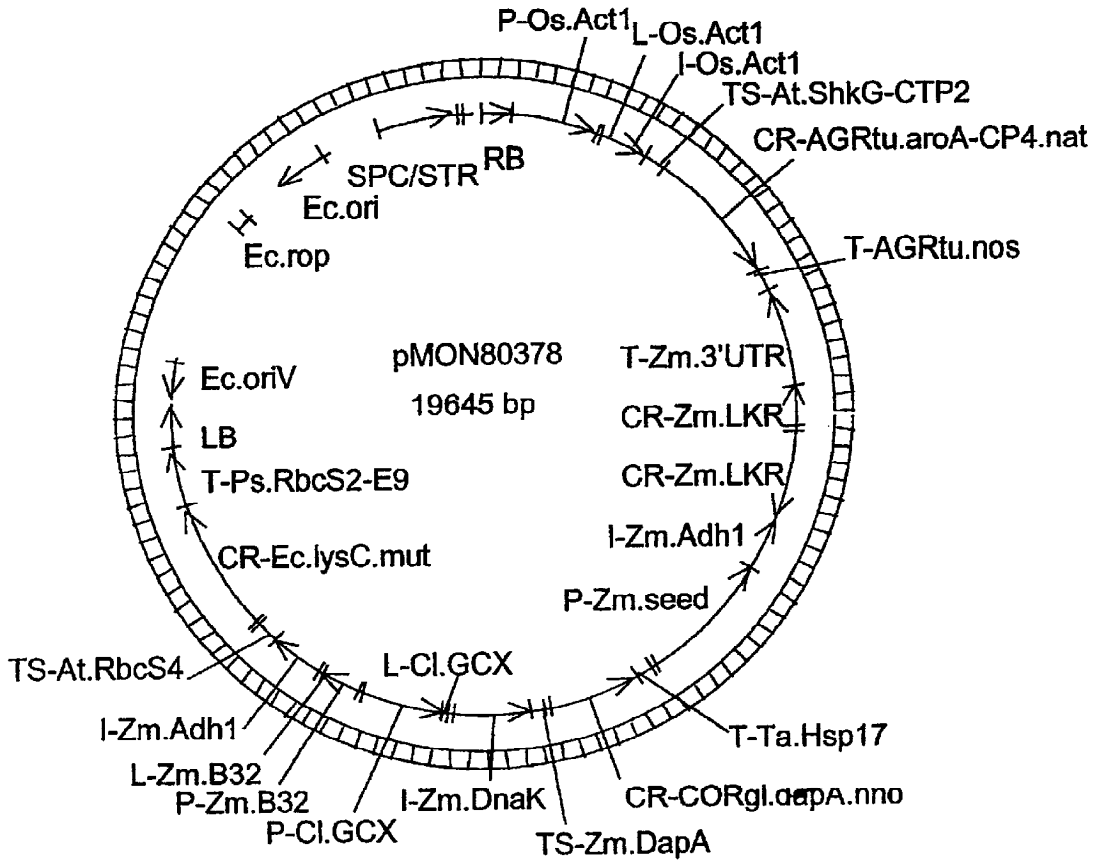
ФИГ.3



ФИГ.4

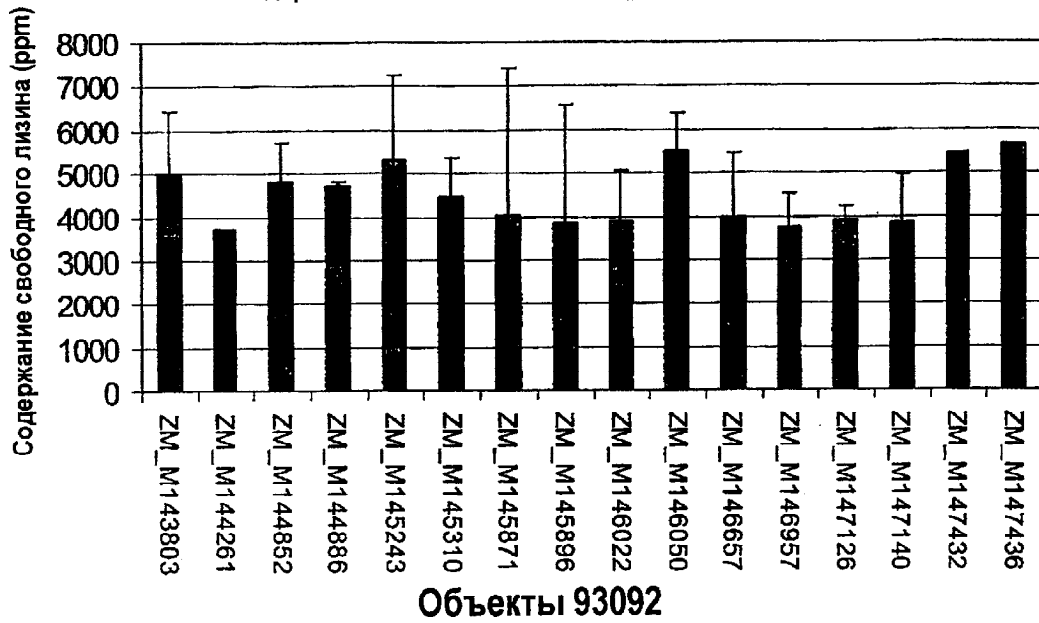


ФИГ.5



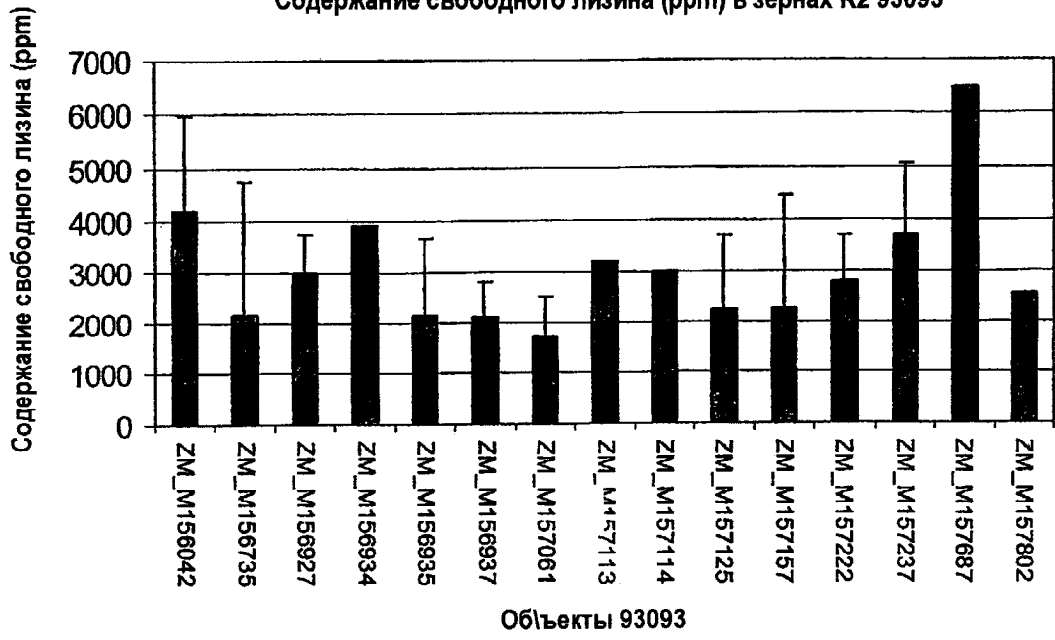
ФИГ.6

Содержание свободного лизина (ppm) в зернах R2 93092



ФИГ.7

Содержание свободного лизина (ppm) в зернах R2 93093



Объекты 93093

ФИГ.8