

Даний винахід відноситься до способів генетичної інженерії рослин, застосованих для зміни компонентів сім'я рослин. Більш конкретно, даний винахід відноситься до промоторів, які були одержані з льону і здатні управляти експресією неприродних генів в сім'ї льону, а також сім'ї інших рослин.

Льон або льон звичайний (*Linum usitatissimum*) є комерційно важливою олійною культурою. Льняна олія і кормова мука з макухи льняного сім'я є цінними сировинними матеріалами, що отримуються з сім'я льону. Додатковий економічно важливий сировинний матеріал, льняне волокно, отримують з стеблини цієї рослини. Олійну фракцію льону використовують для нехарчових цілей, наприклад, у виробництві лака і фарби, і нещодавно цю фракцію стали застосовувати у виробництві ряду придатних в їжу продуктів, таких як маргарини і олії і заправки для салатів, завдяки нещодавно введеним так званим сортам Linola (Green (1986) Can. J. Plant Sci., 66: 499-503). Льняну муку використовують передусім як компонент кормів жуйних тварин, тоді як льняне волокно використовують у виробництві льняних тканин. Внаслідок економічної важливості льону як джерела сировинних матеріалів, бажано було б додатково поліпшувати і різноманітнити "портфель" сортів льону як відносно агрономічної продуктивності, наприклад, урожаю сім'я, стійкості до патогенів і низьких кліматичних температур, так і відносно виходу і якості сировинних матеріалів для задоволення подальших застосувань. Хоча можна одержувати покращені сорти льону шляхом загальноприйнятої селекції рослин, як це доводиться розвитком сортів Linola, виведення елітної лінії агрономічної рослини вимагає великих інвестицій в селекцію рослин через тривалість часу, необхідного для селекції. Технологія генетичної інженерії рослин дозволяє виділяти гени безпосередньо з неродинних видів і переносити ці гени в елітні агрономічні попередні культури, значно зменшуючи тим самим час, необхідний для виведення нових сортів. Крім того, генетична інженерія рослин робить можливою виробництво продуктів, що не одержуються природно з льону, наприклад, терапевтичних агентів.

Для виведення нових сортів льону за допомогою генетичної інженерії рослин вирішальне значення має регуляція експресії чужорідного або неприродного гена, що вводиться. Бажані характеристики експресії для неприродного гена, такі як рівень експресії неприродного гена, конкретні тканина або орган рослини, в яких експресується цей неприродний ген, і конкретний час в циклі росту рослини, в який цей неприродний ген експресується, буде варіюватися в залежності від застосування, для якого розробляється дана лінія рослини. Наприклад, модифікація складу олії сім'я може вимагати низьких рівнів сім'я специфічної експресії ферменту, що бере участь в метаболізмі жирних кислот на ранній стадії розвитку сім'я (див., наприклад, патент США 5 420 034). З іншого боку, експресія фармацевтичного білка може переважно вимагати високих рівнів листя специфічної експресії при зборі листя рослин (див., наприклад, патент США 5 929 304).

Для маніпулювання характеристиками експресії неприродних генів можна впливати на численні фактори. Одним чинником є вибір промотору транскрипції, що використовується. У цей час доступний широкий спектр сумісних з рослинами промоторів, і деякі з кращих задокументованих промоторів включають в себе конститутивні промотори, такі як промотор 3.5-S CaMV (Rothstein et al. (1987), Gene 53:153-161) і промотор убікитину (Патент США 5 614 399), тканеспецифічні промотори, такі як сім'яспецифічні промотори, наприклад, промотор фазеоліну (Sengupta-Gopalan et al., (1985), PNAS USA 82: 3320-3324), і промотори, що індукуються, як такі, що індукуються теплом (Czamencka et al., (1989), Mol. Cell. Biol. 9 (8): 3457-3464), ультрафіолетовим світлом (УФ), елісаторами і пошкодженням (Lois et al., (1989) EMBO J. 8 (6): 1641-1648), або хімікаліями, наприклад, ендогенними гормонами (Skriver et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(16): 7266-7270). Інші фактори, якими можна маніпулювати для регуляції параметрів експресії неприродного гена в рослинах, включають в себе фактори модифікації транскрипції, такі як інтрони, сайти поліаденілювання і сайти термінації транскрипції. Можна також маніпулювати параметрами експресії неприродного гена за допомогою чинників, які впливають на трансляцію, таких як сайти скріплення рибосоми і зміщення кодонів, яка виявляється господарем. Крім того, сам неприродний ген може впливати на життєздатність трансгенної рослини, зокрема, на можливі рівні експресії. У деяких випадках можна подолати цю проблему, експресією білка тканеспецифічним образом, наприклад, в листі або сім'ї, або обмеженням накопичення білка в різних субклітинних компартментах, таких як, наприклад, цитоплазма, ендоплазматичний ретикулум або вакуолі, звичайно в присутності; або за відсутності специфічних націлюючих послідовностей, здатних направляти даний білок в ці компартменти. Іншим чинником, який буде впливати на параметри експресії, є місцеположення, в якому конструкція вбудована в хромосому господаря. Цей ефект міг би дати пояснення тому, чому різні рослини, трансформовані однією і тією ж рекомбінантною конструкцією, можуть мати рівні експресії рекомбінантного білка, що коливаються.

Наскільки відомо авторам винаходу, експресія неприродних генів в сім'ї льону документована тільки в Патентній заявці PCT WO 98/18948. Ця заявка описує два гени, що кодують стеарол-ацильний білок-носії десатурази (SAD), одержані з льону. Асоційовані з SAD промоторні послідовності застосовні для модифікації льону і інших рослин для експресії ендогенних або чужорідних генів. Однак, способи, описані WO 98/18948, обмежуються тим фактом, що промотори SAD не є сім'яспецифічними у льоні і забезпечують експресію в листі, стеблинах, квітках і сім'ї. Таким чином, експресія неприродних генів може приводити до небажаних побічних ефектів в тканинах, що не є тканиною сім'я. Крім того, застосування промоторів SAD дозволяє регулювати рівень експресії і таймінг експресії в обмежених межах.

Існує необхідність подальшого поліпшення способів експресії неприродних генів в сім'ї льону і сім'ї інших рослин.

Даний винахід відноситься до поліпшених способів для сім'яспецифічної експресії неприродних генів в рослинах. Зокрема, даний винахід відноситься до вдосконалених способів сім'яспецифічної експресії неприродних генів у льоні.

Таким чином, в одному аспекті даний винахід представляє спосіб експресії представляючої інтерес послідовності нуклеїнової кислоти в сім'ї льону, що включає:

(а) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' → 3' -напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючи інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору льону;

(b) введення, вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону; і

(c) вирощування, вказаної клітини рослини льону в зрілу рослину льону, здатну зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору льону.

У переважному варіанті даного винаходу, щонайменше одна характеристика експресії, наприклад, таймінг експресії в життєвому циклі рослини, що забезпечується промотором неприродної послідовності нуклеїнової кислоти, є схожою з характеристикою експресії, яка надається природній послідовності нуклеїнової кислоти. У додаткових переважних варіантах, сім'яспецифічним промотором льону є промотор олеозину, промотор запасного білка 2S або промотор бобово-подібного запасного білка сім'я.

У наступному аспекті даний винахід представляє трансгенне сім'я льону, одержане у відповідності до способу, що включає:

(a) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' → 3' - напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючи інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору;

(b) введення вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону; і

(c) вирощування вказаної клітини рослини льону в зрілу рослину льону, здатну зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору. У наступному аспекті даний винахід представляє рослину льону здатні зав'язувати сім'я, одержане способом, що включає:

(a) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' → 3' - напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючи інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору;

(b) введення вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону; і

(c) вирощування вказаної клітини рослини льону в зрілу рослину льону, здатне зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору.

Ще в одному додатковому аспекті, даний винахід представляє нові сім'яспецифічні промотори льону, застосовні для експресії неприродних генів в сім'ї льону і сім'ї інших видів рослин, застосовні, наприклад, для модифікації складу білка або олії цього сім'я.

У переважному варіанті сім'яспецифічний промотор включає:

(a) послідовність нуклеїнової кислоти, показану на фігурі 1 (SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) або фігурі 4 (SEQ ID NO:8), де T може бути також U;

(b) послідовність нуклеїнової кислоти, яка комплементарна послідовності нуклеїнової кислоти (a);

(c) послідовність нуклеїнової кислоти, яка має істотну гомологію послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти (a) або (b);

(d) послідовність нуклеїнової кислоти, яка є аналогом послідовності нуклеїнової кислоти (a), (b) або (c); або

(e) послідовність нуклеїнової кислоти, яка гібридується з послідовністю нуклеїнової кислоти (a), (b), (c) і (d) при жорстких умовах гібридизації.

В іншому аспекті даний винахід включає химерні послідовності нуклеїнових кислот, що містять першу послідовність нуклеїнової кислоти, отриману з льону, функціонально пов'язану з другою послідовністю нуклеїнової кислоти, неприродною відносно вказаної першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому вказана перша послідовність нуклеїнової кислоти містить новий сім'я специфічний промотор льону.

Інші ознаки і переваги даного винаходу стануть легко зрозумілими з наступного докладного опису. Повинне бути зрозуміло, що докладний опис і конкретні приклади, що показують переважні варіанти даного винаходу, приводяться тільки як ілюстрація, оскільки різноманітні зміни і модифікації в рамках ідеї і об'єму даного винаходу будуть очевидними фахівцям в даній області з даного докладного опису.

Тепер даний винахід буде описаний з посиланням на малюнки, на яких:

Фігура 1 показує послідовність ДНК (SEQ ID NO:1) геномного клону льону, що кодує білок олеозин 16,0 кД (SEQ ID NO:2 I3).

Фігура 2 показує послідовність ДНК (SEQ ID NO:4) геномного клону льону, що кодує білок олеозин 18,6 кД (SEQ ID NO:5).

Фігура 3 показує послідовність ДНК (SEQ ID NO:6) геномного клону льону, що кодує запасний білок 2S (SEQ ID NO:7).

Фігура 4 показує послідовність ДНК (SEQ ID NO:8) геномного клону льону, що кодує бобово-подібний запасний білок 54,5 кД (SEQ ID NO:9-12).

Фігура 5 показує Саузерн-блот-аналіз геномної ДНК льону, зондованої послідовностями ДНК олеозину льону.

Фігура 6 показує Нозерн-блот-аналіз сім'яспецифічної експресії олеозинів льону.

Фігура 7 показує Нозерн-блот-аналіз експресії в процесі розвитку олеозинів льону під час розвитку сім'я.

Фігура 8 показує активність GUS зародків льону, бомбардованих генними конструкціями промотор олеозину льону-GUS-термінатор.

Фігура 9 показує експресію GUS в зародках льону, що розвиваються і сім'ї Arabidopsis рослин, трансформованих гібридом промотор гена білка 2S-GUS.

Фігура 10 показує тканеспецифічну експресію GUS в трансгенних рослинах льону, трансформованих генною конструкцією промотор лініну-GUS-термінатор лініну.

Фігура 11 показує часову експресію GUS в трансгенних рослинах льону, трансформованих генною конструкцією промотор лініну-GUS -термінатор лініну.

Фігура 12 показує експресію GUS в трансгенних рослинах *Brassica napus* (L1-L9), трансформованих генною конструкцією промотор лініну-GUS-термінатор лініну.

Фігура 13 показує експресію GUS в трансгенних рослинах *Arabidopsis*, трансформованих генною конструкцією промотор лініну-GUS-термінатор лініну, на різних стадіях розвитку сім'я.

Як згадувалося вище, даний винахід відноситься до вдосконалених способів експресії неприродних генів в рослинах, зокрема, льоні. Даний винахід представляє способи, що роблять можливою сім'яспецифічну експресію неприродних генів у льоні. Способи даного винаходу є вигідними тому, що досягається поліпшена регуляція експресії неприродних генів в сім'ї льону. Експресія неприродного гена обмежується сім'ям, що обмежує потенціал небажаних побічних ефектів, що виникають з експресії в інших органах і тканинах рослини. Крім того, забезпечена методологія дозволяє удосконалити контроль над параметрами експресії, такими як рівень експресії неприродного гена і таймінг експресії неприродного гена в циклі розвитку рослини. Способи даного винаходу особливо корисні завдяки тому, що відповідно до даного винаходу склад сім'я відносно цінних сировинних матеріалів, таких як олія, білок і полісахариди, може бути змінений як якісно, так і кількісно.

Таким чином, в одному аспекті даний винахід представляє спосіб експресії представляючої інтерес послідовності нуклеїнової кислоти, що включає:

(а) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' → 3' -напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючу інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору льону;

(b) введення вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону і

(c) вирощування вказаної клітини рослини, льону в зрілу рослину льону, здатне зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору льону.

У застосуванні тут, термін "неприродний" відноситься до будь-якої послідовності нуклеїнової кислоти, в тому числі послідовності РНК або ДНК, яка звичайно не асоційована з сім'яспецифічним промотором. Цей термін включає в себе гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, які одержані з іншого виду рослини, ніж промотор, а також гомологічні послідовності нуклеїнових кислот, які одержані з того ж самого виду рослини, що і промотор, але не є пов'язаними з цим промотором в рослині дикого типу (нетрансгеннійрослині).

Неприродна послідовність нуклеїнової кислоти при скріпленні з сім'яспецифічним промотором, отриманим з льону, приводить до утворення химерної конструкції. Цю химерну конструкцію вводять в клітину рослини льону для створення трансгенної клітини рослини льону, що приводить до детектовано відмінному фенотипу даної клітини рослини льону або рослини льону, вирощеної з неї, в порівнянні з нетрансгенною клітиною рослини льону або рослиною льону, вирощеною з неї. Безперервна послідовність нуклеїнової кислоти, ідентична послідовності нуклеїнової кислоти цієї химерної конструкції, не присутня в нетрансформованих клітинах рослини льону або рослині льону, вирощеній з неї. У цьому відношенні, химерні молекули нуклеїнових кислот включають ті послідовності, які містять промотор льону, пов'язаний з послідовністю нуклеїнової кислоти, одержаною з іншого виду рослини, або послідовністю нуклеїнової кислоти з льону, але звичайно не пов'язаною з даним промотором. Химерні послідовності нуклеїнових кислот, в застосуванні тут, включають в себе також послідовності, що містять промотор льону і послідовність нуклеїнової кислоти, яка звичайно пов'язана з цим промотором, але додатково що містять неприродну послідовність нуклеїнової кислоти. Наприклад, якщо промотор являє собою специфічний для сім'я льону промотор олеозину, послідовності, "неприродні" для промотору олеозину льону, включають в себе також послідовність, що містить гібрид гена олеозину льону, природно пов'язаного з промотором олеозину, з представляючою інтерес кодууючою послідовністю, яка природно не пов'язана з цим промотором. Термін "неприродний" включає в себе також гібридний ген, описаний вище, який додатково включає в себе послідовність розщеплення, що розділяє послідовність нуклеїнової кислоти, яка звичайно пов'язана з промоторною послідовністю, і ген, що кодує представляючий інтерес білок.

Термін "послідовність нуклеїнової кислоти" означає послідовність нуклеотидних або нуклеозидних мономерів, що складаються з основ, цукрів і міжцукрових (каркасних) зв'язків що природно зустрічаються. Цей термін включає в себе також модифіковані або заміщені послідовності, що містять ті, що не зустрічаються в природі мономери або їх частини, які функціонують схожим образом; Послідовності нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути рибонуклеїновими (РНК) або дезоксирибонуклеїновими (ДНК), кислотами і можуть містити основи, що природно зустрічаються, в тому числі аденін, гуанін, цитозин, тимідин і урацил. Ці послідовності можуть також містити модифіковані основи, такі як ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил-, 2-пропіл- і інші алкіладеніни, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 6-азаурацил, 6-азацитозин і 6-азатимін, псевдоурацил, 4-тіоурацил, 8-галогенаденін, 8-аміоаденін, 8-тіоладенін, 8-тіоалкіладеніни, 8-гідроксилладенін і інші 8-заміщені аденіни, 8-галогенгуаніни, 8-аміогуанін, 8-тіолгуанін, 8-тіоалкілгуаніни, 8-гідроксилгуанін і інші 8-заміщені-гуаніни інші аза- і деазаурацили, тимідини, цитозини, аденіни або гуаніни, 5-трифторметилурацил і 5-трифторцитозин.

Термін "сім'яспецифічний" промотор означає, що ген, який експресується під контролем промотору, переважно експресується в сім'ї рослини при відсутності експресії або без істотної експресії, звичайне менше за 5% від загального рівня експресії, в інших тканинах рослини.

У наступному аспекті даний винахід представляє нові сім'яспецифічні промотори льону, застосовні для експресії неприродних генів в сім'ї льону і сім'ї інших видів рослин. Ці промотори можуть бути використані для модифікації, наприклад, складу білка, олії або полісахаридів цього сім'я. У переважному варіанті,

сім'яспецифічний промотор включає:

(а) послідовність нуклеїнової кислоти, показану на фігурі 1 (SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) або фігурі 4 (SEQ ID NO:8), де Т може бути також У;

(b) послідовність нуклеїнової кислоти, яка комплементарна послідовності нуклеїнової кислоти (а);

(с) послідовність нуклеїнової кислоти, яка має істотну гомологію послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти (а) або (b);

(d) послідовність нуклеїнової кислоти, яка є аналогом послідовності нуклеїнової кислоти (а), (b) або (с); або

(е) послідовність нуклеїнової кислоти, яка гібридується з послідовністю нуклеїнової кислоти (а), (b), (с) і (d) при жорстких умовах гібридизації.

Термін "послідовність, яка має істотну гомологію послідовності" означає ті послідовності нуклеїнових кислот, які мають незначні або неістотні зміни послідовності від послідовностей, описаних в (а) або (b), тобто послідовності, які функціонують по суті таким же чином і здатні направляти сім'яспецифічну експресію неприродних послідовностей нуклеїнових кислот. Ці зміни можуть бути пов'язані з локальними мутаціями або структурними модифікаціями. Послідовності нуклеїнових кислот, які мають істотну гомологію, включають в себе послідовності нуклеїнових кислот, що мають щонайменше 65%-ну, більш переважно щонайменше 85%-ну і найбільш переважно 90-95%-ну ідентичність з послідовностями нуклеїнових кислот, показаними на фігурі 1 (SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) або фігурі 4 (SEQ ID NO:8).

Термін "послідовність, яка гібридується" означає послідовність нуклеїнової кислоти, яка може гібридуватися з послідовністю (а), (b), (с) або (d) при жорстких умовах гібридизації. Відповідні "жорсткі умови гібридизації", які стимулюють гібридизацію ДНК, відомі фахівцям в даній області або можуть бути знайдені в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Наприклад, можуть використовуватися наступні умови: 6,0 x хлорид натрію/цитрат натрію (SSC) при приблизно 45°C з подальшою промивкою 2,0 x SSC при 50°C. Жорсткість може бути вибрана на основі умов, що використовуються в стадії промивки. Наприклад, концентрація солі в стадії промивки може бути вибрана з високої жорсткості близько 0,2 x SSC при 50°C.

Крім того, температура в стадії промивки може бути при умовах високої жорсткості, при близько 65°C.

Термін "послідовність нуклеїнової кислоти, яка є аналогом" означає послідовність нуклеїнової кислоти, яка була модифікована в порівнянні з послідовністю (а), (b) або (с), причому ця модифікація не змінює застосовність цієї послідовності (тобто як сім'яспецифічного промотору), описану тут. Модифікована послідовність або аналог можуть мати поліпшені властивості в порівнянні з послідовністю, показаною в (а), (b) або (с). Одним прикладом модифікації для одержання аналога є заміна однієї з основ, що природно зустрічаються (тобто аденіну, гуаніну, цитозину або тимідину) послідовності, показаної на фігурі 1, фігурі 2, фігурі 3 або фігурі 4, модифікованим основою, такою як ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил-, 2-пропіл- і інші алкіладеніни, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 6-азаурацил, 6-азацитозин і 6-азатимін, псевдоурацил, 4-тіоурацил, 8-галогенаденін, 8-аміноаденін, 8-тіоладенін, 8-тіоалкіладеніни, 8-гідроксиладенін і інші 8-заміщені аденіни, 8-галогенгуаніни, 8-аміногуанін, 8-тіолгуанін, 8-тіоалкілгуаніни, 8-гідроксилгуанін і інші 8-заміщені гуаніни, інші аза- і деазаурацили, тимідини, цитозини, аденіни або гуаніни, 5-трифторметилурацил і 5-трифторцитозин.

Інший приклад модифікації включає в себе модифіковані гетероатоми фосфору або кисню в фосфатному скелеті, коротколанцюгові алкільні або циклоалкільні міжцукрові зв'язки або коротколанцюгові гетероатомні або гетероциклічні міжцукрові зв'язку в молекулі нуклеїнової кислоти, показаній на фігурі 1, фігурі 2, фігурі 3 або фігурі 4. Наприклад, послідовності нуклеїнових кислот можуть містити фосфоротіоати, фосфотриєфіри, метилфосфонати і фосфородитіоати.

Додатковим прикладом аналога молекули нуклеїнової кислоти даного винаходу є пептиднуклеїнова кислота (ПНК), в якій дезоксирибоза- (або рибоза-) фосфатний скелет в ДНК (або РНК) замінений поліамідним скелетом, який схожий зі скелетом, що виявляється в пептидах (P.E. Nielsen, et al. Science 1991, 254, 1497). Було показано, що ПНК-аналоги є стійкими до деградації ферментами і мають пролонговане існування *in vivo* і *in vitro*. ПНК також сильніше зв'язуються з комплементарною послідовністю ДНК внаслідок відсутності, зумовленої зарядом відштовхування між ланцюгами ПНК і ДНК. Інші аналоги нуклеїнових кислот можуть містити нуклеотиди, що містять полімерні скелети, циклічні скелети або ациклічні скелети. Наприклад, ці нуклеотиди можуть мати структури морфоліно-скелету (Патент США 5 034 506). Аналоги можуть, також містити групи, наприклад, репортерні групи, групу для поліпшення фармакокінетичних або фармакодинамічних властивостей послідовності нуклеїнової кислоти.

В іншому аспекті даний винахід представляє химерні послідовності нуклеїнових кислот, що містять першу послідовність нуклеїнової кислоти, отриману з льону, функціонально пов'язану з другою послідовністю нуклеїнової кислоти, неприродною відносно вказаної першої послідовності нуклеїнової кислоти, причому вказана перша послідовність нуклеїнової кислоти містить новий сім'яспецифічний промотор льону. Переважно, цей промотор вибраний з групи промоторів, фігури 1, фігури 2, фігури 3 або фігури 4 або послідовність нуклеїнової кислоти, що гібридується з ними при жорстких умовах.

Відповідно до даного винаходу, химерні послідовності нуклеїнових кислот можуть бути включені відомим образом в рекомбінантний експресуючий вектор, який забезпечує хорошу експресію в клітині сім'я. Таким чином, даний винахід включає в себе рекомбінантний експресуючий вектор, що містить химерну послідовність нуклеїнової кислоти даного винаходу, придатний для експресії в клітині сім'я.

Термін "відповідний для експресії в клітині сім'я" означає, що рекомбінантні експресуючі вектори містять химерну послідовність нуклеїнової кислоти даного винаходу, регуляторну ділянку і ділянку термінації, вибрану на основі клітини сім'я, яка повинна використовуватися для експресії, яка функціонально пов'язана з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид бажаного амінокислотного складу. Термін "функціонально пов'язаний" означає, що химерна послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує цей поліпептид, пов'язана з регуляторною послідовністю і ділянкою термінації, які роблять можливою експресію в

клітині сім'я. Типова конструкція складається, в напрямі 5' → 3', з регуляторної ділянки, що закінчується промотором, здатним направляти експресію в рослині, ділянкою, що кодує поліпептид, і ділянкою термінації транскрипції, функціональними в клітинах рослин. Ці конструкції можуть бути одержані відповідно до методології, добре відомої фахівцям в області молекулярної біології (див., наприклад, Sambrook et al. (1990), Molecular Cloning, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press). Одержання конструкцій може включати в себе такі способи, як рестрикційне розщеплення, лігування, гель-електрофорез, секвенування ДНК і ПЛР. Велика різноманітність клонуючих векторів доступна для виконання необхідних стадій клонування. Особливо відповідними для цієї мети є клонуючі вектори з системою реплікації, яка є функціональною в *Escherichia coli*, такі як pBR322, серія pUC, серія M13mp, pACYC184, pBluescript і т.д. Послідовності нуклеїнових кислот можуть бути введені в ці вектори, і ці вектори можуть бути використані для трансформації *E. coli*, яка може вирощуватися у відповідному середовищі. Плазмідні можуть бути витягнуті з цих клітин при зборі і лізисі клітин. Кінцеві конструкції можуть бути введені в рослинні вектори, сумісні по інтеграції в рослину, такі як Ti-і Ri-плазмідні.

Способи експресії неприродних генів в сім'ї льону відповідно до даного винаходу можуть здійснюватися з використанням будь-якого сім'яспецифічного промотору льону і не обмежуються конкретним вибраним сім'яспецифічним промотором льону. У переважних варіантах даного винаходу сім'яспецифічний промотор льону додає неприродній послідовності нуклеїнової кислоти, щонайменше, один параметр експресії, який схожий або ідентичний параметру експресії, що додається природній послідовності нуклеїнової кислоти природним промотором. Термін "параметр експресії" в застосуванні тут означає будь-яку вимірну властивість або дію, що додається сім'яспецифічним промотором льону послідовності нуклеїнової кислоти, функціонально пов'язаної з цим сім'яспецифічним промотором льону. Таким чином, в переважних варіантах, таймінг експресії в життєвому циклі рослини неприродної послідовності нуклеїнової кислоти є схожим або ідентичним з таймінгом експресії природної послідовності нуклеїнової кислоти. У додаткових переважних варіантах, рівень експресії гетерологічної послідовності нуклеїнової кислоти є схожим або ідентичним рівню експресії природної послідовності нуклеїнової кислоти. У додаткових характерних варіантах, реакція неприродного гена на зміни в умовах освітлення, змінах в довжині хвилі або інтенсивності світла, наприклад, на зміни температури, пошкодження тканини, зміни в концентрації хімічних агентів, наприклад, фітогормонів і - пестицидів, є східною з реакцією природної послідовності нуклеїнової кислоти на ці стимули. Інші бажані параметри експресії, що додаються сім'яспецифічним промотором льону, можуть бути відомі фахівцям в даній області, і сім'яспецифічний промотор льону може бути вибраний відповідно до цього.

Сім'яспецифічні промотори льону, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу, включають в себе промотори, пов'язані із запасними білками сім'я, такими як все альбуміни і глобуліни, в тому числі віцілін- і бобово-подібні білки, а також сім'яспецифічні промотори, не пов'язані із запасними білками сім'я, такі як промотори олеозинів. Особливий інтерес представляють також промотори, асоційовані з метаболізмом жирних кислот, наприклад, промотори білка-носія ацилу (ACP), сатураз, десатураз, елонгаз і т.п.

У переважних варіантах даного винаходу сім'яспецифічним промотором, що використовується є промотор олеозину, промотор бобово-подібного запасного білка сім'я або промотор запасного білка 2S. В особливо переважних варіантах сім'яспецифічний промотор має послідовність, показану на фігурі 1, фігурі 2, фігурі 3 або фігурі 4, або будь-які інші послідовності, одержані з льону і які гібридизуються з будь-якою з цих чотирьох послідовностей нуклеїнових кислот при жорстких умовах.

Додаткові сім'яспецифічні промотори можуть бути використані відповідно до даного винаходу. Ці промотори можуть бути одержані різними способами. Якщо був виділений білок сім'я льону, він може бути частково секвенований, так що може бути сконструйований нуклеїновокислотний зонд для ідентифікації РНК, специфічної для цього сім'я. Для додаткового посилення РНК, специфічно пов'язаної з сім'ям, може бути одержана кДНК з клітин сім'я, і з цієї кДНК можуть бути відняті мРНК або кДНК з клітин не сім'я (з інших тканин). Потім кДНК сім'я, що залишилася можна використати для зондування бібліотеки геномної ДНК на комплементарні послідовності. Послідовності, які гібридизуються з цією кДНК, можуть бути потім одержані, і асоційована з ними промоторна ділянка може бути виділена. Можна також піддати скринінгу бібліотеки геномної ДНК, одержані з тканин сім'я льону, з використанням відомих сім'яспецифічних генів з інших видів рослин і потім виділити їх асоційовані промотори. Через відносну велику кількість запасних білків сім'я в сім'ї можна також отримати інформацію про послідовність за допомогою випадкового секвенування бібліотек кДНК сім'я льону. Ці послідовності кДНК, відповідні послідовності відомих запасних білків льону, можуть бути використані для ідентифікації, асоційованого з ними промотору. Бази даних, що містять інформацію про послідовність з великомасштабного секвенування, наприклад, з *Arabidopsis* і кукурудзи, можуть бути піддані пошуку на відомі сім'яспецифічні білки і/або промотори, і ця інформація може бути використана для ідентифікації промоторних послідовностей в льоні, які мають схожість послідовності. Можуть бути використані альтернативні способи, для виділення додаткових сім'яспецифічних промоторів льону, і фахівцями в даній області можуть бути виявлені і використані відповідно до даного винаходу нові сім'яспецифічні промотори льону.

Представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, пов'язана з промотором, може бути будь-якою представляючою інтерес послідовністю нуклеїнової кислоти, в тому числі будь-якою РНК- або ДНК-послідовністю, що кодує представляючий інтерес пептид або білок, наприклад, фермент, або послідовністю, комплементарною геномній послідовності, причому ця геномна послідовність може бути щонайменше однією з відкритих рамок прочитання, нітроном, некодируючою лідерною послідовністю або будь-якою послідовністю, причому ця комплементарна послідовність буде інгібувати транскрипцію, процесінг месенджер-РНК, наприклад, сплайсінг або трансляцію. Представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти може бути синтетичною, природно виділеною або їх комбінацією. Представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти могла б бути фрагментом природної послідовності, наприклад, включати тільки каталітичний домен або структуру особливої важливості. У залежності від природи представляючої інтерес нуклеїнової кислоти може бути бажаним синтез цієї послідовності з переважними для рослин кодонами. Переважні для рослин

кодони можуть бути визначені з кодонів найвищої частоти зустрічності в білках, експресованих в найбільшій кількості представляючих інтерес конкретних видів рослин.

Представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти може кодувати будь-який з різноманітних рекомбінантних білків. Приклади рекомбінантних білків, які можуть експресуватися способами даного винаходу, включають в себе білки з сприятливою каталітичною функцією або цінний білок, який буде нагромаджуватися до високих рівнів і екстрагуватися, якщо бажано. Білки з каталітичною функцією включають в себе, але не обмежуються ними, білки, які додають новий біохімічний фенотип сім'ю, що розвивається. Нові фенотипи можуть включати в себе такі модифікації, як змінений склад білків сім'я або олії сім'я або склад полісахаридів сім'я, підвищене продукування попередньо існуючих бажаних продуктів або властивостей і зменшення або навіть супресію небажаного генного продукту з використанням антисмислової технології, рибозиму або технології ко-супресії (Izant and Weintraub (1984) Cell 26: 1007-1015, антисмислові; Hazelhoff and Gerlach (1988) Nature 334: 585-591, рибозим; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2: 279-289, ко-супресія).

Очікується, що бажані білки могли б експресуватися у всіх зародкових тканинах, хоч в різних зародкових тканинах, таких як зародкова вісь і сім'ядолі, може бути виявлена різна клітинна експресія. Представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти може експресуватися на будь-якій стадії в розвитку сім'я. Таймінг експресії може залежати від конкретної застосовності даного винаходу. Експресія ферментів, що беруть участь в модифікації олії, може бути бажаною на ранній стадії розвитку сім'я, наприклад, перед накопиченням запасного білка сім'я.

Крім промоторної ділянки і представляючої інтерес послідовності нуклеїнової кислоти, послідовність нуклеїнової кислоти, здатну термінувати транскрипцію, звичайно включають в експресуючі вектори. Термінатори транскрипції переважно являють собою близько 200 - 1000 пар нуклеотидних основ і можуть містити будь-які такі послідовності, функціональні в рослинах, такі як ділянки термінації нопалінсинтази (Bevan et al., (1983) Nucl. Acid. Res. 11: 369-385), термінатор фазеоліну (van der Geest et al., (1994) Plant J. 6(3): 413-423), термінатор гена октопінсинтази *Agrobacterium tumefaciens* або інші подібним образом функціонуючі елементи. Ці ділянки термінації транскрипції можуть бути одержані, як описане An (1987), Methods in Enzym. 153: 292, або можуть вже бути присутніми в плазмідах, доступних з комерційних джерел, таких як ClonTech, Palo Alto, California. Вибір відповідного термінатора впливає на швидкість транскрипції.

Химерна конструкція може додатково містити енхансери, такі як лідер AMV (Jobling and Gehrke (1987), Nature 325: 622-625), або інтрони. Повинно бути зрозуміло, що конструкція експресуючого вектора може залежати від таких чинників, як вибір виду рослини і/або типу поліпептиду, який експресується.

Експресуючі вектори звичайно містять також маркерні генів. Маркерні гени включають в себе всі гени, які дозволяють відрізнити трансформовані клітини рослини від нетрансформованих клітин, в тому числі селектовані і придатні для скринінгу маркерні гени. Зручно, коли маркер може бути маркером стійкості до гербіциду, наприклад, гліфозату або фосфінотрицину, або до антибіотика, такого як канаміцин, G418, блеоміцин, гіроміцин, хлорамфенікол і т.п., які додають ознаку, на яку може бути проведений відбір за допомогою хімічних засобів. Маркери, що скринуються, можуть бути використані для ідентифікації трансформантів за допомогою спостереження. Вони включають в себе, але не обмежуються ними, β -глюкуронідазу або геном uidA, ген β -лактамази або зелений флуоресцентний білок (Niedz et al. (1995) Plant Cell Rep. 14: 403).

Для введення послідовностей нуклеїнових кислот в клітини рослин для фахівця загалом доступні різні способи. Повідомлялося про опосередковану *Agrobacterium* трансформацію клітин рослин льону, і трансформанти льону можуть бути одержані у відповідності до способів, описаними Dong and McHughen (1993) Plant Science 88: 61-77, хоча багато які інші способи (див. нижче) можуть бути також використані для введення химерних конструкцій ДНК в клітини льону, якщо бажано.

Трансформованим рослинам льону, вирощеним відповідно до загальноприйнятих сільськогосподарських способів, відомих особі з кваліфікацією в даній області, дають зав'язати сім'я. Потім сім'я льону може бути одержане із зрілих рослин льону і аналізовані на бажані змінні властивості в порівнянні з сім'ям дикого типу.

Два або більше поколінь рослин можуть бути вирощені і або перехресно запилені, або самозапилені для ідентифікації рослин і штамів з бажаними фенотипічними характеристиками, включаючи вироблення рекомбінантного поліпептиду. Може бути бажаним забезпечення гомозиготності в рослинах для гарантії безперервного успадкування рекомбінантної ознаки. Способи відбору гомозиготних рослин добре відомі фахівцям в області селекції рослин і включають в себе періодичне самозапилення і відбір і культивування пильовиків і мікроспор. Гомозиготні рослини можуть також бути одержані шляхом трансформації гаплоїдних клітин або тканин з подальшою регенерацією гаплоїдних паростків, що потім перетворюються в диплоїдні рослини будь-яким числом відомих способів (наприклад, обробкою колхіцином або іншими руйнуючими мікротрубочки агентами).

Даний винахід включає в себе також трансгенне сім'я льону, одержане у відповідності до способу, що передбачає:

(а) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' \rightarrow 3' -напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючу інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору;

(b) введення вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону; і

(c) вирощування вказаної клітини рослини льону в зрілу рослину льону, здатну зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору.

У переважних варіантах даного винаходу сім'яспецифічний промотор вибраний з групи сім'яспецифічних промоторів льону, що складається з промотору запасного білка 2S, промотору глобуліну, промотору олеозину і промотору бобово-подібного запасного білка сім'я. Специфічні промоторні послідовності показані на фігурі 1

(SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) і фігурі 4 (SEQ ID NO:8).

Далі, даний винахід представляє рослини льону, здатні зав'язувати сім'я, одержане способом, що включає:

(а) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5'→3' -напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, одержаний з льону; і

(2) представляючу інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, причому вказана представляюча інтерес нуклеїнова кислота є неприродною відносно вказаного сім'яспецифічного промотору;

(b) введення вказаної химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини льону; і

(с) вирощування вказаної клітини рослини льону в зрілу рослину льону, здатну зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору.

Далі даний винахід представляє способи застосування нових промоторів, показаних на фігурі 1 (SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) і фігурі 4 (SEQ ID NO:8), у видах рослин, інших, чим льон. Таким чином, даний винахід включає в себе також одержання химерних конструкцій нуклеїнових кислот, що містять промотор, вибраний з групи промоторів, показаних на фігурі 1, фігурі 2, фігурі 3 і фігурі 4, і представляючу інтерес послідовність нуклеїнової кислоти, і експресію послідовності нуклеїнової кислоти сім'яспецифічним образом у видах рослин, інших, чим льон, під контролем промотору льону.

В іншому аспекті даного винаходу представлений спосіб експресії представляючої інтерес нуклеїнової кислоти в сім'ї рослин, що включає:

(а) одержання химерної конструкції нуклеїнової кислоти, що містить в 5' → 3' -напрямі транскрипції у вигляді функціонально пов'язаних компонентів

(1) сім'яспецифічний промотор, вибраний з групи сім'яспецифічних промоторів, що складається з

(i) послідовності нуклеїнової кислоти, показаної на фігурі 1 (SEQ ID NO:1), фігурі 2 (SEQ ID NO:4), фігурі 3 (SEQ ID NO:6) або фігурі 4 (SEQ ID NO:8), де Т може бути також У;

(ii) послідовності нуклеїнової кислоти, яка комплементарна послідовності нуклеїнової кислоти (а);

(iii) послідовності нуклеїнової кислоти, яка має істотну гомологію послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти (1) або (ii); і

(iv) послідовності нуклеїнової кислоти, яка є аналогом послідовності нуклеїнової кислоти (i), (ii) або (iii);

(v) послідовності нуклеїнової кислоти, яка гібридизується з послідовністю нуклеїнової кислоти (i), (ii), (iii) або (iv) при жорстких умовах гібридизації; і (2) вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти;

(b) введення химерної конструкції нуклеїнової кислоти в клітину рослини;

(с) вирощування вказаної клітини рослини в зрілу рослину, здатну зав'язувати сім'я, причому вказана представляюча інтерес послідовність нуклеїнової кислоти експресується в сім'ї під контролем вказаного сім'яспецифічного промотору.

Різні способи доступні для введення послідовностей нуклеїнових кислот, зокрема, ДНК, в рослинні клітини-господарі, загалом. Наприклад, химерні конструкції ДНК можуть бути введені в клітини-господарі, одержані з дводольних рослин, таких як тютюн, і олійних видів, таких як *Brassica napus*, з використанням стандартних векторів *Agrobacterium* за допомогою протоколу трансформації, наприклад, описаного Moloney et al. (1989), *Plant Cell Rep.* 8: 238-242 або Hinchey et al. (1988) *Bio/Technol.* 6: 915-922; або інших способів, відомих фахівцям з кваліфікацією в даній області. Наприклад, застосування Т-ДНК для трансформації рослинних клітин отримало інтенсивне дослідження і досить повно описано в Європейському патенті EP 0 120 516, Hoekema et al., (1985), Chapter V In: *The Binary Plant Vector System* Offset-drukkerij Kanter BV, Alblisserdam; Knauf et al. (1983), *Genetic Analysis of Host Expression by Agrobacterium*, p. 245, In: *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction*, Puhler, A. ed. Springer-Verlag NY; and An et al., (1985), (*EMBO J.*, 4: 277-284). Трансформація *Agrobacterium* може бути також використана для трансформації однодольних видів рослин (Патент США 5 591 616).

Зручним образом, експлантати можуть культивуватися з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для створення можливості перенесення транскрипційної конструкції в рослинну клітину-господаря. Після трансформації з використанням *Agrobacterium* клітини рослин диспергують у відповідне середовище для відбору, потім витягують калус, паростки і зрештою рослини. *Agrobacterium*-господар буде нести плазмиду, що містить гени *vir*, необхідні для перенесення Т-ДНК в клітини рослин. Для ін'єкції і електропорації (див. нижче) "роззброєні" Ті-плазмиди (що не мають пухлинних генів, зокрема, дільниці Т-ДНК) можуть бути введені в рослинну клітину.

Застосування способів без використання *Agrobacterium* дозволяє застосовувати конструкції, описані тут, для одержання трансформації і експресії у великій різноманітності однодольних і дводольних видів рослин. Ці способи особливо застосовні для трансформації видів рослин, які є неподатливими в системі трансформації з *Agrobacterium*. Інші способи для перенесення генів включають в себе бомбардування частками (Sanford (1988), *Trends in Biotechnol.* 6: 299-302), електропорацію (Fromm et al., (1985), *PNAS USA*, 82: 5824-5828; Riggs and Bates, (1986), *PNAS USA* 83:5602-5606), опосередковане ПЕГ поглинання ДНК (Potrykus et al., (1985). *Mol. Gen. Genetics*, 199: 169-177), мікроін'єкцію (Reich et al., *Bio/Technol.* (1986) 4:1001-1004) і карборундові віскери (Kaepler et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9:415-418).

У наступних, конкретних додатках, наприклад, для *B. napus*, клітини-господарі, націлені на прийом рекомбінантних конструкцій ДНК, звичайно отримують з черешків сім'ядоль, як описане Moloney et al. (1989), *Plant Cell Rep.* 8: 238-242. Інші приклади з використанням комерційного олійного сім'я включають в себе трансформацію сім'ядоль в експлантатах сої (Hinchey et al. (1988) *Bio/Technol.* 6: 915-922) і трансформацію стеблін бавовнику (Umbeck et al., (1987) *Bio/Technol.* 5: 263-266).

Після трансформації клітини, наприклад, листові диски, вирощують в селективному середовищі. Як тільки починають проростати паростки, їх відрізають і вміщують на вкорінююче середовище. Після утворення

достатньої кількості коріння, ці рослини переносять в ґрунт. Потім передбачувані трансформовані рослини випробовують на присутність маркера. Саузерн-блотінг виконують на геномній ДНК з використанням відповідного зонда, щоб показати інтеграцію в геном клітини-господаря.

Способи, представлені в даному винаході, можуть бути використані в поєднанні з великим спектром видів рослин. Особливо переважні клітини рослин, що застосовуються відповідно до даного винаходу, включають в себе клітини з наступних рослин: сої (*Glycine max*), рапсу (*Brassica napus*, *Brassica campestris*), соняшника (*Helianthus annuus*), бавовнику (*Gossypium hirsutum*), кукурудзи (*Zea mays*), тютюну (*Nicotiana tabacum*), люцерни (*Medicago sativa*), пшениці (*Triticum sp.*), ячменю (*Hordeum vulgare*), вівса (*Avena sativa L.*), сорго (*Sorghum bicolor*), *Arabidopsis thaliana*, картоплі (*Solanum sp.*), льону/льону звичайного (*Linum usitatissimum*), сафлору (*Carthamus tinctorius*), гвінейської олійної пальми (*Eleais guineensis*), земляного горіха (*Arachis hypogaea*), американського горіха (*Bertholletia excelsa*), кокосового горіха (*Cocos nucifera*), кліщовини (*Ricinus communis*), коріандру (*Coriandrum sativum*), гарбуза крупноплодного столового (*Cucurbita maxima*), жожоба (*Simmondsia chinensis*) і рису (*Oryza sativa*).

Даний винахід має численні застосування, які включають в себе поліпшення внутрішньої цінності сім'я рослин за допомогою накопичення ними змінених поліпептидів або нових рекомбінантних пептидів або за допомогою включення або усунення метаболічної стадії. Застосування даного винаходу може приводити до поліпшеної якості білка (наприклад, збільшеним концентраціям незамінних або рідких амінокислот), поліпшеної якості ліпідів за допомогою модифікації складу жирних кислот або поліпшеному або збільшеному складу вуглеводів. Приклади включають в себе експресію багатих сіркою білків, таких як білки, виявлені в люпині і американському горісі, в сім'ї, з сірко-невмісними амінокислотами. Поліпшена якість білків могла б також досягатися експресією білка або фрагмента білка, який збагачений незамінними амінокислотами, в тому числі лізином, цистеїном, метіоніном і триптофаном. Альтернативно, міг би експресуватися (жирний ацил)-кофермент А-трансферазний фермент, здатний модифікувати співвідношення жирних кислот в тригліцеридах (запасних ліпідах). У випадках, коли рекомбінантному білку дозволяють нагромаджуватися в сім'ї, цей білок міг би бути також пептидом, який має фармацевтичну або промислову цінність. У цьому випадку цей пептид можна було б екстрагувати з сім'я і використовувати в неочищеному або очищеному вигляді, в залежності від того, як це потрібно для передбачуваного використання. Поліпептиди, які експресуються в сім'ї, можуть бути також фрагментами або похідними природного білка. Фармацевтично застосовні білки можуть включати в себе, але не обмежуються ними, антикоагулянти, такі як гірудин, антитіла, в тому числі моноклональні антитіла і фрагменти антитіл, вакцини, цитокіни або фактори росту, такі як бичачий фактор росту, холінергічний фактор диференціювання (CDF), циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), фактор росту фібробластів (FGF), фактор росту риб, гонадотролін, колонієстимулюючий фактор гранулоцитів (G-CSF), колонієстимулюючий фактор гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF), гормон росту людини, інтерферон альфа (IFN- α), інтерферон бета (IFN- β), інтерферон гамма (IFN- γ), інтерлейкін 1-альфа (IL-1 α), інтерлейкін 1-бета (IL-1 β), інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-3 (IL-3), інтерлейкін-4 (IL-4), інтерлейкін-5 (IL-5), інтерлейкін-6 (IL-6), інтерлейкін-10 (IL-10), інгібуючий фактор лейкозу (LIF), тіоредоксин, колонієстимулюючий фактор макрофагів (M-CSF), фактор росту мієломоноцитів, фактор росту нервової тканини (NGF), онкостатин М, фактор росту тромбоцитів (PDGF), пролактин, що трансформує фактор росту альфа (TGF- α), трансформуючий фактор росту бета2 (TGF- β 2), фактор некрозу, пухлин альфа (TNF- α) і фактор некрозу пухлин бета (TNF- β). Фармацевтично корисні білки можуть також включати в себе білки ссавців, наприклад, але не тільки, а-1-антитрипсин, білки, діючі проти ожиріння, білки крові, колаген, колагеназу, еластин, еластазу, ентеропептидазу, фібриноген, гемоглобін, сироватковий альбумін людини, інсулін, лактоферин, міоглобін і білки легеневого сурфактанту.

Застосовні в промисловості пептиди можуть включати, але не обмежуються ними, α -амілазу або інші амілази, амілоглюкозидазу, арабіназу, каталазу, целобіогідролазу, целюлази, хітинази, хімотрипсин, дегідрогенази, ендоглюканазу, химозин, ендогалактаназу, естерази, β -галактозидазу, α -галактозидазу або інші галактозидази, шлункові ліпази, глюканази, глюкозоізомеразу, геміцелюлази, гідролази, ізомеразу, лігнінази, ліпази, ліази, ліоцими, оксидази, оксидоредуктазу, папаїн, пектинази, пектинліази, пероксидази, фосфатази, фітази, протеази, пулуланази, редуктази, серинові протеази, тіоредоксин, трансферазу, трипсин і ксиланазу.

Приведені далі необмежувальні приклади є такими, що ілюструють даний винахід.

Приклад 1

Виділення сім'яспецифічних промоторов льону

Сім'яспецифічні кДНК-клони виділяли з бібліотеки сім'яспецифічних кДНК льону. Ці кДНК-клони секвенували і використовували BLAST (спрощений інструмент пошуку з локальним зіставленням) для порівняння цих послідовностей з іншими в загальнодоступних базах даних, таких як Genbank. Це порівняння виявило, що розшифрована амінокислотна, послідовність декількох з виділених кДНК мала високу міру схожості з олеозинами як низькомолекулярного, так і високомолекулярного класу, альбуміном 2S і бобово-подібними запасними білками. Отримували зонди індивідуально з (частин) кДНК, що кодують олеозини, альбумін 2S і бобово-подібні запасні білки, і їх використовували для скринінгу геномної бібліотеки, отриманої з лінії Forge льону, яка є гомозиготною відносно чотирьох генів стійкості до іржі (Anderson et al. (1997), The Plant Cell 9: 641-651). Після скринінгу з високою жорсткістю були ідентифіковані декілька позитивних лямбда-клонів для кожного зонда. Вставки субклонували в плазмідний вектор pBluescript і секвенували. Інформація послідовності виявила, що автори виділили, геномні копії кДНК олеозинів, альбуміну 2S і бобово-подібних білків. Інформація послідовності геномних клонів, що містять послідовності, що кодують високо- і низькомолекулярні ізоформи олеозинів, альбумін 2S, і гена бобово-подібного білка представлені на фігурах 1-4, відповідно.

Фігура 1 і SEQ ID NO:1 показують ДНК-послідовність геномного клону льону, що кодує білок олеозину 16,0 кД (низькомолекулярного або L-ізоформи). Ідентифіковані і вказані передбачувані регуляторні елементи. Вони включають в себе інвертовані повтори (пари основ 805-813 і 821-829; пари основ 1858-1866 і 1877-1885), прямі

повтори (пари основ 184-193 і 1102 і 1111); пари основ 393-402 і 1701-1710); пари основ 683-692 і 1546-1555; пари основ 770-781 і 799-810; пари основ 955-964 і 1936-1945; пари основ 1483-1496 і 1513-1526; чутливий до абсцизової кислоти елемент (ABRE) (пари основ 1859-1866), CACA-бокс (пари основ 1933-1936), TATA-бокс (пари основ 1925-1931) і CAT-бокс (пари основ 1989-1993). Вказаний також сигнал поліаденілювання (пари основ 3020-3025). Відкрита рамка прочитання уривається 1 коротким нітроном (який відмічений), і 2 екзону трансклюються і вказані в однобуквених амінокислотних кодах IUPAC.

Фігура 2 і SEQ ID NO:4 показують ДНК-послідовність геномного клону льону, що кодує білок олеозину 18,6 кД (високомолекулярного або Н-ізоформи). Ідентифіковані і вказані передбачувані регуляторні елементи. Вони включають в себе прямі повтори (пари основ 14-25 і 1427-1438; пари основ 80-89 і 1242-1251; пари основ 177-186 і 837-846; пари основ 1281-1290 і 1242-1251; пари основ 1591-1600 і 1678-1687). Відкрита: рамка прочитання не уривається нітронами і трансклюється і показана в однобуквених амінокислотних кодах IUPAC.

Фігура 3 і SEQ ID NO:6 показують ДНК-послідовність геномного клону льону, що кодує запасний білок 2S. Нуклеотидне секвенування цього клону виявило, що він має відкриту рамку прочитання з 174 амінокислот, яка показує гомологію з групою рослинних запасних білків 2S. Ця послідовність кодує відкриту рамку прочитання із 38% загальною схожістю із запасним білком 2S *Brassica oleracea*, в тому, числі володіє абсолютним консерватизмом багатого глутаміном відрізка QQQGQQGQQQ (SEQ ID NO:13). Крім того, промотор гена запасного білка 2S містив передбачувані промоторні регуляторні елементи. Вони включають в себе багаті AT повтори (пари основ 25-36, 97-108 і 167-190), RY-подібний повтор (пари основ 240-247), G-бокс-подібний елемент (пари основ 274-280), сім'яспецифічний бокс-подібний мотив (пари основ 285-290) і TATA-бокс (пари основ 327-333).

Фігура 4 і SEQ ID NO:8 показують ДНК-послідовність геномного клону льону, що кодує бобово-подібний запасний білок сім'я льону 54,4 кД. Цей ген бобово-подібного. запасного білка сім'я буде називатися також "лініном". Розшифровану амінокислотну послідовність гена лініну порівнювали з бобово-подібним білком з *R. communis*, попередником бобових з *M. salicifolia*, *Q. robur* і *G. hirsutum*, попередником глутеліну з *O. sativa* і запасним білком сім'я 12 S з *A. thaliana*. Ген лініну показує ідентичність/схожість послідовності з відповідними білками з *R. communis*, *M. salicifolia*, *Q. robur*, *G. hirsutum*, *O. sativa* і *A. thaliana* 59/15, 47/16, 50/17, 45/17, 43/18 і 43/18 процентів, відповідно. Ідентифіковані і вказані передбачувані регуляторні елементи промоторної ділянки. Вони включають в себе інвертовані повтори (пари основ 265-276 і 281-292; пари основ 513-524 і 535-545), повтори (пари основ 1349-1360 і 1367-1378; пари основ 1513-1529 і 1554-1572), чутливий до абсцизової кислоти елемент (ABRE) (пари основ 1223 і 1231), бокс бобових (RY-повтори) (між парами основ 1223 і 1231), можлива ділянка боксу віціліну (пари основ 1887-1894), CAAT-бокс (пари основ 1782-1785) і TATA-бокс (пари основ 1966-1970). Показаний також сигнальний пептид для націлювання на мембрану EP (пари основ 2034-2080). Відкрита рамка прочитання уривається 3 короткими нітронами (які відмічені), і 4 екзони трансклюються і вказані в однобуквених амінокислотних кодах IUPAC.

Фігура 5 показує Саузерн-блот-аналіз геномної ДНК льону. 60 мкг геномної ДНК льону виділяли з листя, розщеплювали EcoRI (доріжка 1), HindIII (доріжка 2) і BamHI (доріжка 3) і наносили на відповідні доріжки. А) Гібридизації виконували з випадковим образом праймованою ³²P-міченою 3Т-кДНК (високомолекулярної ізоформи олеозину льону). В) Гібридизації виконували з випадковим образом праймованою ³²P-міченою 7R-кДНК (низькомолекулярної ізоформи олеозину льону). Ці результати показують, що кДНК леозину 3Т (високомолекулярної ізоформи олеозину), і 7R (низькомолекулярної ізоформи олеозину) гібридизуються з геномної ДНК льону. Більш конкретно, ці результати показують, що 3Т, мабуть, представляє 2-копійний ген в льоні, як видно з двох смуг в кожній доріжці розщеплення. Подібним образом, 7R, мабуть, представляє мультигенне сімейство льону, оскільки були виявлені численні смуги для кожного розщеплення.

Приклад 2

Сім'яспецифічна експресія генів олеозину льону

Фігура 6 показує Нозерн-блот-аналіз сім'яспецифічної експресії олеозинів льону. Здійснювали Нозерн-гібридизацію мРНК двох олеозинів в різних тканинах. Десять мкг загальної РНК екстрагували з різних тканин, R, корінь; C, сім'ядоля; L, лист; S, насіннєва капсула; E, зародок. Мембрану зондували (А) кДНК, що кодує високомолекулярну (Н) ізоформу (ідентичної кодуєчій послідовності, представленої на фігурі 2), і (В) кДНК, що кодує низькомолекулярну (L) ізоформу (ідентичної кодуєчій послідовності, представленої на фігурі 1). Обидва транскрипти експресуються тільки в зародку і насіннєвій капсулі, яка містить зародки.

Приклад 3

Експресія генів олеозину льону під час розвитку сім'я

Фігура 7 показує Нозерн-блот-аналіз експресії олеозинів льону під час розвитку сім'я. 15 мкг на доріжку загальної РНК наносили в кожну доріжку на агарозному/формальдегідному гелі і блотували на мембрану HybondN+. 10J: Цю мембрану зондували з використанням ³²P-dCTP-міченої кДНК олеозину льону (низькомолекулярної ізоформи). Вказані стадії представляють число днів після, цвітіння (DPA). 3Т 15 мкг на доріжку загальної РНК наносили в кожну доріжку на агарозному/формальдегідному гелі і блотували на мембрану HybondN+. 3Т: Цю мембрану зондували з використанням ³²P-dCTP-міченою кДНК олеозину льону (високомолекулярної ізоформи). Обидва транскрипти експресувалися на ранній стадії розвитку (6 DPA, рання стадія сім'ядолі). Експресія є максимальною при 16-20 DPA (пізня стадія сім'ядолі) і знижується при 22 DPA (зрілі зародки).

Приклад 4

Тимчасова сім'яспецифічна експресія β-глюкуронідази (GUS) під регуляторним контролем регуляторних послідовностей олеозину льону

Дві конструкції отримували з використанням стандартних способів молекулярної біології (наприклад, див. Sambrook et al. (1990), Molecular Cloning, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press), в тому числі розщеплень рестриктазами, лігування і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Конструкція pSC54: Репортерну кодуєчу послідовність р-глюкуронідази з вектора GUSN358>S (Clontech Laboratories) вміщували між промоторною послідовністю від нуклеотиду 21 до нуклеотиду 1852 і

термінаторною послідовністю від 2395 до 3501 (як описано на фігурі 1). Цю вставку клонували в pBluescript і одержаний вектор названий pSC54.

Конструкція pSG60: Репортерну кодуючу послідовність р-глюкуронідази з вектора GUSN358>S (Clontech Laboratories) вміщували між промоторною послідовністю від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 2023 і термінаторною послідовністю від 2867 до 3925 (як описано на фігурі 2). Цю вставку клонували в pBluescript і одержаний вектор названий pSC60.

pSC54, pSC60 і не утримуючу промотору конструкцію GUS (контроль) вводили в зародки льону з використанням бомбардування частками за допомогою стандартних протоколів (наприклад, див. Abenes et al. (1997) Plant Cell reports 17:1-7). Фігура 8 показує активність GUS зародків льону, бомбардованих pSC54, pSC60 і не утримуючу промотору конструкцією GUS, виміряну через 48 годин після бомбардування частками. Як можна бачити, регуляторні послідовності олеозину льону є достатніми для напряду експресії GUS в зародках льону.

Приклад 5

Стабільна сім'яспецифічна експресія β-глюкуронідази (GUS) в льоні і Arabidopsis під регуляторним контролем промотору гена запасного білка 2S

Конструкцію репортерного гена GUS отримували шляхом вбудовування 5' і 3' ділень фрагмента ДНК, описаного на фігурі 3, в не утримуючий промотору вектор GUS pBI101 таким чином.

Амплікон 400 п.н. з 5'-кінця ДНК-фрагмента, описаного на фігурі 3, ампліфікували з використанням ПЛР із застосуванням наступних праймерів (місцеположення показано на Фіг.3):

5' праймер (1): 5'-TCCACATATGTAGGTCATA-3' (SEQ ID NO:14)

3' праймер (1): 5'-CTTTAAGGTGTGAGAGTC-3' (SEQ ID NO:15)

Ці ПЛР-праймери містили також сайти рестрикції для HindIII і BamHI, які використовували для клонування 5'UTR-амплікону 400 п.н. в сайти HindIII/BamHI вектора pBI101 попереду репортерного гену GUS. Амплікон 736 п.н. з 3'-нетрансльованої ділянки (3'-UTR) ДНК-фрагменту, описаної на фігурі 3, ампліфікували з використанням ПЛР із застосуванням наступних праймерів (місцеположення показано на Фіг.3):

5' праймер (2): 5'-AGGGGTGATCGATTA-3' (SEQ ID NO:16)

3' праймер (2): 5'-GATAGAACCCACACGAGC-3' (SEQ ID NO:17)

Ці ПЛР-праймери містили також сайти рестрикції для SacI і EcoRI. Ділянку термінації NOS вектора pBI101 вирізали розщепленням SacI/EcoRI і замінювали подібним образом розщепленим ампліконом 3'UTR 736 п.н. ДНК-фрагменту, описаного на фігурі 3. Потім репортерну конструкцію GUS електропорували в штам Agrobacterium tumefaciens AGL1 і трансформацію льону (Finnegan et al. (1993) Plant Mol Biol. 22(4): 625-633) і Arabidopsis (Valvekens et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5536-5540) проводили відповідно до описаних раніше протоколів.

Різні тканини з рослин льону і Arabidopsis, несучі репортерну конструкцію GUS, аналізували гістологічно на виявлення активності GUS. У випадку льону, тканину листа, тканину кореня і зародки середньої зрілості, вирізані з сім'я, що розвивається, забарвлювали на активність GUS. Для Arabidopsis, із сім'я, що розвивається забарвлювали на GUS in situ в їх стручках.

Забарвлення GUS проводили зануренням тканин в гістохімічний буфер, що містить 0,5 мМ Х-глюк, 0,5 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 1 мМ ЕДТА, 0,5м сорбітал, 0,5 мМ феріціанід калію і 0,5 мМ фероціанід калію. Реакцію фарбування проводили протягом 12-16 годин при 37°C і цю реакцію зупиняли додаванням 95% етанолу. Тканини потім освітлювали звільненням від хлорофілу промивкою в 95% етанолі перед фотографуванням. Фігура 9 показує явний доказ сильної активності GUS в зародках льону, що розвиваються і сім'ї Arabidopsis і відсутність доказу експресії репортерного гена GUS в корінні або листі льону або в стінках стручків Arabidopsis.

Приклад 6

Стабільна сім'яспецифічна експресія β-глюкуронідази (GUS) у льоні, Arabidopsis і Brassica napus під регуляторним контролем регуляторних послідовностей гена бобово-подібного запасного білка льону

Конструкцію отримували з використанням стандартних способів молекулярної біології, в тому числі розщеплень рестриктазами, лігування і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для одержання ДНК-фрагменту, що містить приблизно 2 т.п. н. з 5'-ділянки ініціації транскрипції бобово-подібного запасного білка сім'я льону, в конфігурації, відповідній для лігування в кодуючу GUS послідовність, використали підхід на основі ПЛР. Він включав в себе застосування полімеразної ланцюгової реакції для ампліфікації точної послідовності, бажаної для експресійного аналізу. Для виконання необхідної ПЛР-ампліфікації синтезували два олігонуклеотидних праймери (Beckman Oligo 1000M ДНК-синтезатор), які мають наступні послідовності:

5'- праймер: 5'TATCTAGACTCAAGCATACGGACAAGGGT 3' (SJ-634) (SEQ ID NO:18)

Зображені курсивом основи відповідають нуклеотидним положенням 1-21 в послідовності, представлений на фігурі 4. Додаткові 5'-нуклеотиди цієї послідовності в праймері не є ідентичними промоторній послідовності, але були включені для вміщення сайту XbaI в 5'-кінці продукту ампліфікації. Сайт XbaI (5'-TCTAGA-3') (SEQ ID NO: 19) підкреслений.

Синтезували другий праймер (3'), який мав наступну послідовність:

3'-праймер: 5'GGTTATCATTTGTATGAAGTGA 3' (SJ-618) (SEQ ID NO:20)

Цей праймер містить точний комплемент (показаний курсивом) послідовності, показаної на фігурі 4 від основи 2343 до основи 2363. Цей праймер сконструйований без додаткового сайту рестриктази внаслідок того, що природний сайт NcoI (5'-CCATGG-3') (SEQ ID NO:21) охоплює стартовий кодон між парами основ 2034 і 2039, роблячи тим самим можливою вставку промотору запасного білка у відповідний клонуючий вектор.

Ці два праймери використали в реакції ПЛР-ампліфікації з одержанням ДНК-фрагменту, що містить послідовність між нуклеотидом 1 і нуклеотидом 2342 гена запасного білка сім'я льону з сайтом XbaI на 5'-кінці і сайтом NcoI на відстані 302 п.н. від 3'-кінця. ПЛР-ампліфікацію виконували з використанням ферменту Pfu (Stratagene) із застосуванням умов, що рекомендуються виробником ферменту, і програми температур 94°C

(денатурація) протягом 1 хв., 55°C (відпал) протягом 1 хв. і 72°C (подовження) протягом 3,5 хв. Матрицею був геномний клон запасного білка сім'я бобових, показаний на фігурі 4.

Потім одержаний продукт ампліфікації розщеплювали XbaI і NcoI для видалення бажаної промоторної ділянки 2 т.п. н. Цей промоторний фрагмент клонували в сайти XbaI і NcoI розщепленої XbaI і NcoI плазмиди, названої pGUS1318 (плазмиду pGUSN358S (Clontech Laboratories) розрізали NcoI і EcoRI і вставку GUS клонували в pBluescriptKS+ (Stratagene), яка була пристосована для змісту сайту NcoI в сайті множинного клонування). Одержана плазміда, що містить гібрид промотор-GUS, була названа pGUS1318. Термінатор запасного білка сім'я бобового з льону також ампліфікували з вищезазначеного геномного клону. Для виконання необхідної ПЛР-ампліфікації синтезували олігонуклеотидні праймери, що мають наступні послідовності:

5'- праймер: 5' GCAAGCTTAATGTGACGGTGAAATAATAACGG 3' (SJ-620) (SEQ ID NO:22)

Зображені курсивом основи відповідають нуклеотидним положенням 3780-3803 в послідовності, представлений на фігурі 4. Додаткові 5'-нуклеотиди від цієї послідовності в даному праймері не є ідентичними даній промоторній послідовності, але були включені для вміщення сайту HindIII в 5'-кінці продукту ампліфікації. Сайт HindIII (5'-AAGCTT-3') (SEQ ID NO:23) підкреслений.

Синтезували другий праймер (3'), який мав наступну послідовність:

3'-праймер: 5'TAGGTACCTGGCAGGTAAAGACTCTGCTC 3' (SJ-618) (SEQ ID NO:24)

Цей праймер містить точний комплемент (показаний курсивом) послідовності, показаної на фігурі 4 від основи 4311 до основи 4290. Додаткові 5'-нуклеотиди від цієї послідовності в праймері не є ідентичними промоторній послідовності, але були включені для вміщення сайту KpnI на 5'-кінці продукту ампліфікації. Сайт KpnI (5'-GGTACC-3') (SEQ ID NO:25) підкреслений.

Ці два праймери використали в реакції ПЛР-ампліфікації з одержанням ДНК-фрагменту, що містить послідовність між нуклеотидом 3779 і нуклеотидом 4311 термінатора гена запасного білка сім'я льону з сайтом HindIII на 5'-кінці і сайтом KpnI на 3'-кінці. ПЛР-ампліфікацію виконували, як описано вище. Вищезгаданий вектор pGUS1318, який містить ампліфікований промотор, розщеплювали XhoI і обробляли фрагментом Кленова для створення тупого кінця. Потім цей вектор розщеплювали KpnI і ампліфіковану, як описано вище, термінаторну послідовність вбудовували таким чином, що вона була розташована 3' (праворуч) від кодуючої GUS послідовності. Одержаний вектор, що містить промотор запасного білка сім'я льону, GUS і термінатор запасного білка сім'я льону, названий pGUST.

Вставку XbaI-KpnI pGUST, яка містить конструкцію промотор лініну-кодуюча GUS послідовність-термінаторна послідовність лініну, лігували в сайти XbaI-KpnI pSBS3000 (Цей вектор є похідним бінарної плазмиди pPZP221 *Agrobacterium* (Hajdukiewicz et al., 1994, *Plant Molec. Biol.* 25: 989-994). В pSBS3000 рослинний ген стійкості до гентаміцину pPZP221 був замінений конструкцією промотор убикитину петрушки-ген фосфінотрицин-ацетилтрансферази-послідовність термінації убикитину петрушки для придання стійкості до гербіциду глюфозинату амонію). Одержаний вектор названий pSBS2089. Крім того, вставка XbaI-KpnI pGUST, яка містить конструкцію промотор лініну-кодуюча GUS послідовність-термінаторна послідовність лініну, лігували в сайти XbaI-KpnI бінарної плазмиди pCGN1559 *Agrobacterium* (MacBride and Summerfield, 1990, *Plant Molec. Biol.* 14: 269-276, яка додає стійкість до антибіотика канаміцину)). Одержаний вектор був названий pSBS2083. Плазмиди pSBS2089 і pSBS2083 електропорували в штам *Agrobacterium* EHA101. Штам *Agrobacterium* EHA101 (pSBS2089) використали для трансформації льону і *Arabidopsis*, штам *Agrobacterium* EHA101 (pSBS2083) використали для трансформації *Brassica napus*. Трансформацію льону виконували по суті, як описано в Jordan and McHughen (1988) *Plant cell reports* 7: 281-284, за винятком того, що трансгенні паростки відбирали на 10 мкМ L-фосфінотрицині, замість канаміцину. Трансформацію *Arabidopsis* виконували по суті, як описано в "Arabidopsis Protocols; Methods in Molecular Biology" Vol. 82. Edited by Martinez-Zapater IM and Salinas J. ISBN 0-89603-391-0 pg. 259-266 (1988), за винятком того, що гадані трансгенні рослини відбирали на агарозних чашках, що містять 80 мкМ L-фосфінотрицин. Трансформацію *Brassica napus* виконували по суті, як описано в Moloney et al. (1989), *Plant Cell Reports*, 8:238-242.

Фігура 10 показує тканеспецифічну експресію GUS в трансгенних рослинах льону, трансформованих генною конструкцією лінін-GUS (pSBS2089). Експресію GUS вимірювали в корінні (R), стеблах (S), листі (L), бруньках (B) і зародку (E). Деяка експресія спостерігалася в бруньках і максимальна експресія досягалася в тканинах зародка. Не було детектованої експресії в жодній з нетрансформованих тканин (дикого типу, WT).

Фігура 11 показує тимчасову експресію GUS в трансгенних рослинах льону, трансформованих конструкцією лінін-GUS (pSBS2089). Як можна бачити, максимальна експресія досягалася в зрілих (заздалегідь висушених) зародках льону.

Фігура 12 показує абсолютну експресію GUS в трансгенних рослинах *Brassica napus* (L1-L9), трансформованих генною конструкцією лінін-GUS (pSBS2083). Як можна бачити, в рослинах *Brassica napus* може бути досягнутий високий рівень експресії. При порівнянні індивідуальних трансгенних рослин можна також бачити типову варіацію в експресії, зумовлену ефектом позиціонування.

Фігура 13 показує експресію GUS в трансгенних стручках *Arabidopsis* (трансформованих генною конструкцією лінін-GUS (pSBS2089)) під час розвитку сім'я. Як можна бачити, в тканинах сім'я *Arabidopsis* може бути досягнутий високий рівень експресії. Максимальна експресія досягається на стадії 4 (зрілі, але не повністю висохлі) розвитку сім'я. Не спостерігали детектованої експресії в тканинах, що не відносяться до сім'я, таких як листя, стебла, коріння і стінки стручків (результати не показані).

Хоч даний винахід був описаний з посиланням на переважні приклади, повинне бути зрозуміле, що даний винахід не обмежується описаними прикладами.

Навпаки, передбачається, що даний винахід включає в себе різні модифікації і еквіваленти, що знаходяться в рамках ідеї і об'єму прикладеної формули винаходу. Всі публікації, патенти і патентні заявки включені тут як посилання в повному об'ємі, в такій же мірі, як якщо кожна окрема публікація, патент або патентна заявка були особливо і індивідуально вказані як включені в якості посилання в повному об'ємі.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> Chaudhary, Sarita
 van Rooijen, Gijs
 Moloney, Maurice
 Singh, Surinder
 SemBioSys Genetics Inc.
 Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
- <120> Специфічні для сім'я льону промотори
- <130> 9369-147
- <140>
- <141>
- <150> 60/151044
- <151> 1999-08-27
- <150> 60/161,722
- <151> 1999-10-27
- <160> 25
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 4305
- <212> ДНК
- <213> Linum usitatissimum
- <400> 1

```

ttcaaaaccc gattcccgag gcgccctat tgaagatatg ggggaagtgc gacgagatcg 60
atgtcgggtc gagtgcctat gtgatgtgac cgtttggggg gaggatgagc gagatagcca 120
agactagcat tccgttccca cacagagttg ggaatttgta ccaaatccaa cacttgctcg 180
attggagcga cgatagggac gcggaanaac acatccgttg gatcaggag ttgtacgatg 240
atctcgagcc ttatgtgtcg aagaatccga ggtatgctta cgtgaactac agggatctcg 300
acatcgggat gaatggagga ggtgaagggg atgagaaggg tacttatggt gaggctaagg 360
tgtgggggga gaagtacttt ggggtcaact ttgatcggtt ggttcgggtg aagacgattg 420
ttgatcccaa taatgtgttt cgaacgagc agagcattcc ctcaattcca actcggttat 480
aaggatcaat gatcaatgag aattttccct tccaatgtga ttacaagtgc tattgggtca 540
gctttctcaa ctgctccctat tcatttagat taattcataa caactattaa tttaccagcc 600
ttttatccgg cccgttggcc gatttatctt cttaagtctt agatgaatg aaaccgattt 660
agtttttatt gagatgagat taatcttaat ttgcttgaaa ttactcacg gttgatgtga 720
tatttggaat taactaaat gataaatatc ggataaaaat aaaaatattt aaaaataata 780
acataaacat aagaacaata aaataaataa atttaatttt aatttatctt ctgttttctt 840
ttctgtatca tacatctctt ctcttacttc ttaaggcctt ttcaattatc acttaattaa 900
atacaataga taaatcggtt attctataac attaacctat acacttgcaac ggtgaacaat 960
caatatgata atataataat aatataataa ttcaattatt aatctacaat tttttaatta 1020
taaaagttat cgggtcagtt tctgcaagct ccgagctcct tgtcatcgtt agtttctgcy 1080
gtctcaaggt ataacgactc ggagcgacga gccctttgct tccaatggac gggttgcatt 1140
tctgccgtcg ttgagctcga ttggcgtgtc atgctggagt cagagttcct acaaaaaaac 1200
cctaactag aggggtgatta ggggtgaaat aggggtgttg cctgggttcc attgtccaaa 1260
gttttagtca acttaaaaac agacttaaat tttatgcttc aaaaatgttt atctgttatt 1320
atattagcgt gtaattagtc ttgacaatgg ggcgggacgg gtacggattc gggaccccca 1380
tccccgccca tagtgtaatg gctcaactgc caagtcagca ttggaccgaa attattggac 1440
acgaagtact aatgtgaaa acctttacatt tgttattttc tactttaata ctatgctatt 1500
ttcaaaattt gaactttaat actatgtttt tatatagttt agtatatctt aatttttatg 1560
caaatctatc taattgtatt aaactatttt cgtcccgtag ctaattattt cgaaggcaag 1620
tcaaagtgtt attgtggact atgtgagcta atattgaacc tttatctctc ccaaccactc 1680
aagttaattg aaccnaactc gatcgggttg gtttcgagct atttcgagcc attgttgtta 1740
tatgcacgtg agatatcaag attgacccga acacttcatt atgataatgt agaaaaagaa 1800
aacatattct aagactacat gcctgcgaag tgcaaccctt gcattggaag ctgctcaaca 1860
cgtggcatag actcccgcca cgtgtccatt ccacctcatc acctcacccc caccgttcac 1920

```

ctcttattat atcacacaac tcaatcaatc ctactcctcc atactcgaac aaatccgacc 1980
 aacttatacc aatattccca aacttgatta atttctcagc aatatggatc agacgcacca 2040
 gacatacgcc ggaaccacgc agaaccggag ctatggcgcc gggggcaca tgtaccagca 2100
 gcagcagccg aggtcttacc aggcgggtgaa ggcggccact gcagccaccg cgggtggatc 2160
 cctcatcggt ctgtccggtc tcatccttac ggccaccgtc atttcaactca tcatagccac 2220
 cctctcctct gtcattctca gcccgtgtct tgtcccggtc ctcattaccg tgggtctctt 2280
 gatcacgggg tttcttgctt cgggtgggtt cggagtcgcc gccgtcaccg tcttgctctg 2340
 gatctatagg tatgtataag ctttggactt tagtattgtt ataaaataca taagctgatt 2400
 tatgaacatg gatctcccaa caagagttat ttaaatgcat tctcgtctcg actcgatcgg 2460
 ttgggttttg agctactcgg tcacaatggc cgggtcggct ctggatctgt tatactaata 2520
 tttggaagcc tgaagtcca ttgtctgcc ccaactccc actacctttt gaggtgttta 2580
 agaagccata caaactaatt atgaatccct cccaacaact cagaactcga gtcagtgggt 2640
 tgtgacgggt cctctataaac atttcgaaaa tctttgttca atgaacgtag aaatgaccat 2700
 gcttgatgat tgtgggtctt ataaggtacg tgaccggcgg gcaccggcg ggaggggatt 2760
 cgtcgaccca ggctaggctg aagctggcgg gaaagggcag ggaggtgaag gacagggcgt 2820
 cggagtctgc acagcagcat gtcacaggtg gtcaacagac ctttaasaga gactcctcta 2880
 gttaaatttg tctcgttttc tgtttcgtg cggctttaa actctctttt aagtgtgctg 2940
 ttttcttttt gtctcgtgtg ttgtaagtga aagtgtaatc gaagtccaa gttggagatg 3000
 tttgtaacga tgatgttttc taataatcag agatattaaa aggtgtgcta attttagtatt 3060
 gcgtctcgat tcggaccaaa ctcgcaagta aaattgcaga ggtgagttg tacagaacaa 3120
 gcgtgcattg ttctggaagt tcatctcctt ggagccgacc ttgtgtcttg cagtttcgcc 3180
 aagtcacta gacaaatgta cgaagttaag cctctgtcaa cagatcgctc tagcgtccca 3240
 gaaaacacca gatttttcca aaaccatcgg ggatcaattt tccattcaat tccgatcttg 3300
 gaagtacttg aacagaagca tgatgctaaa agataataga aaatcgaagc ctagaaaagt 3360
 tgtacagaaa gcaacaagtc aaaaatatag atcaacttca aaggttcaa ttacatctta 3420
 cagaccctaa aaaaagacag ttaacagaag tgcactaac agaaaccagc cagcttcacc 3480
 tggaaatgaag gagctttgat caatccatcc tagcttcaat cccctttgaa attgcagaca 3540
 gagctctcat cctgctaaaag ctggtggctt attcttaacc ctgcantcaa taagcatgaa 3600
 ctascatttg acactctcat cggcggtatt ctcgaaatc agtgagcgag ggatttacct 3660
 gtgtgtgtag taacctctct ccttgtaact aaaactctga aattccggca tcaactactg 3720
 ccaactttct gcttaaggtg attttatcac caaggtgag cgtgattcct tgcgtcttgc 3780
 tccgaactct gatgtatcca ctgagctttc catctccttc cttctccagg cttatgttca 3840
 ccaatgcgtc ctgcgcgaac acactcttgg cgtacaagt cgcagccagg aatccacact 3900
 tccatcaag tgcagacctg caaaccccaa ataagaacac aaactccaa gtcaacgac 3960
 aattctccgc cttttatgaa gaaaaggaaa cttctgggta cttacggtgc cgtcagacac 4020
 ttcattttg tagacttgat gatattggtc aggaattcct tctcgttctg aattgttgtg 4080
 ttaacagcaa cctgacagac agaaagatat cgaaaattha agatactgg atgactaggc 4140
 acagagaaat gaaatctaatt tctagaagta aaaccttatt ttccattca aattctgccc 4200
 acatagtccg gaacgcagca tcogagcaag aagcaggaga gatgtaatcc atgatatcga 4260
 tgtggatatc gttgaggacg acaactgaac gttccatcac attgg 4305

<210> 2

<211> 109

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 2

Met	Asp	Gln	Thr	His	Gln	Thr	Tyr	Ala	Gly	Thr	Thr	Gln	Asn	Pro	Ser
1				5					10					15	
Tyr	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Met	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Arg	Ser	Tyr
				20				25					30		
Gln	Ala	Val	Lys	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile
				35			40					45			
Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr	Ala	Thr	Val	Ile	Ser	Leu	Ile	Ile
				50			55				60				
Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Pro	Ala	Leu
					70					75				80	
Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe
					85			90						95	

Gly Val Ala Ala Val Thr Val Leu Ser Trp Ile Tyr Arg
100 105

<210> 3

<211> 46

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 3

Tyr Val Thr Gly Gly His Pro Ala Gly Gly Asp Ser Leu Asp Gln Ala
1 5 10 15

Arg Ser Lys Leu Ala Gly Lys Ala Arg Glu Val Lys Asp Arg Ala Ser
20 25 30

Glu Phe Ala Gln Gln His Val Thr Gly Gly Gln Gln Thr Ser
35 40 45

<210> 4

<211> 3501

<212> ДНК

<213> Linum usitatissimum

<400> 4

tctagacatt tgacataaac cgaattcaaa gaacacaaca ttgactaaca ccaaaaagaa 60
atagagtagt gaaatttggg agattaaaa atagaaacaa actgattctt agaaagaaga 120
gatgattagg tgctttcagt tgggtctgtc aggaatcga gatgttcaat tatttacatt 180
gtcgattcat ctccaattg tctgtgttcc ttactgtcc gacgttttt tgaatccag 240
ttaattccca tcaagtcttc cttcagctgc gtagcactgc tagctccaac atggagcgtg 300
gagctcactc gttcattggg catcgcaaa gtttgccttc atgttctgct accagccagc 360
gcccacggcc tcttgggttg gtggacaatt gcggtgaagc ggcgaagttg acatcccata 420
gtctcgacac ttcaccatat ggatgtttaa aacgtatata acgagtgcga tctacatgtc 480
ccatcacacc acatataaag caatagtttt ggagcttttc atatttgaaa cgggcattga 540
cgacttgccc tctcgataat ttaattcttt ttctcttcca gctgattgtg tgcattccatt 600
cgggctcaga agcacatcaa agggatctct ccacgtagt attgggtcgt gtcgtatgat 660
acgaagcagt cgatgaagt tctaatgtg cgagctacag gctccgcaaa gaaccccgca 720
ggtagatcgt atgtagtac ccaaaaatca gtttgcgta gcggaatcaa cactagagac 780
tcacctaat gcattcctat gtgatgaac agtttatcat ttgtgagctc aggggtcatt 840
gtcgatgacc caatgcacat tgagettatg atagaatttg aataggagac gttttccacc 900
cagatcacga atagctaccc ctttttcggg cgccaaatct ccggcatcct atcttccacc 960
acaacttaaa gatgcgatcg gtaaggaaact caccgaccac acacatcgaa taatcttcgg 1020
tgaccgggtc ctgttgatca agtccctcaa ttctctcaac ctagtcttca atcgccgcta 1080
gcgttatccc ccgcataatg actttcatag cgcggagcgt agccggagac gacgagcaag 1140
aaggatgagc ggcggcagat tgcggctaaa gaaacgagct tctgtccttg ctctatggag 1200
gcagatttct gagttgatgg tgatggattt gtgatgtgga cactttttaa ttaagttagt 1260
tttttagcac ttcatccacg taattaaata aataatttcc agtattttat atttatttcc 1320
ttacgttata taattttttg aaagattaaa actttgatat aggcgaagatc atgacacgtc 1380
gaagttaagt gaatgagact cctaacaagg taataacaaa gcagttcata aaccgaatga 1440
ccttgatctt tactaagctt gagatcattg aacatataat taataacggt aatgaaagat 1500
aagaacttta atataaaaat cattcaaaac gagaactga taacaaaaac aaagcaaacg 1560
gccaacaaaa taatagacgg tggagggatg atgcagagcc atccaccctt ttttccagat 1620
ttcttactg cttacttctc tatgcataac acaagacgac cttgaaactt gttagtcatg 1680
cagagccctt actcgccagg tcaccgcacc acgtgttact ctatcacttc tctctccctt 1740
ccttttaaga accaccacgc cacttccctc tcacaaacac tcataaaaaa accactctt 1800
gcatttctcc caagtccaaa ttagttcaca gctaaagcaag aactcaacaa caatggcgga 1860
tcgtacaaca cagccacacc aagtcaggt ccacacccag caccactatc ccacggcgga 1920
ggctttcggc cgttatgaag gtggactcaa aggcgggtcca catcaccagc aaggatcagg 1980
cagcggccca tcagcttcca aggtgttagc agtcatgacc gcgtcccca tcggcgggac 2040
cctcttggc ttggcgggga taaccttggc tgggacgatg atcggtctgg cgatcaccac 2100
cccgaatttt gtcatttgcg gccctgttct agtcccggcc gctctgctca tcgggtttgc 2160
cgtgagcgcg tttctggcct cggggatggc cgggctgaca gggctgacct cgctgtctgt 2220
gtttgcgagg tatctgcagc aggttgggca gggagttgga gtgggggtgc cggatagttt 2280
cgagcaggcg aagagggcga tgcaggatgc tgcagggtat atggggcaga agaccaagga 2340


```

agttgggcag gagatccaga ggaagtctca ggatgtgaaa gcacagaca aataaggtga 2400
taataagggg ttttgggttc gtgtgtaaac tggtaaaatg gaaattctgg gttttactgt 2460
acttttgcac gtagtggaat gaatgagttc ttgttctctt ttgtctttta atcataaagt 2520
aagaagcagc atttcatgtt ctgggtgaat attgtcaaga attcgcaaca aatttagcta 2580
aaccagttca atcttaccgg ttagacgact tcccagtaag aaacattcca ggtccatccc 2640
ggtataagag tctggacttc tgaacccttt agaccttggg tttggaaaaa agatgaaacc 2700
tttagaataa attacaacga tggcagattg taaaaaactg gagtcgagat catgtaaatt 2760
agcccataac taagaaccgg cgatgacaac aattactagg aatatggttg ttgggctggg 2820
cggcgggctag cgggtgatgt ttggaagaat cggggatcca gaatgtgaga accgaatcat 2880
cgacgaacat taccgggcca ggagccatt tcaagcaact ttggaactcc tatatggctg 2940
ttccagcagg ccacctgttc aagaagaaa gaagccatgt cagaaatcct tacgaaatct 3000
aactggatgc tgatatgaat cggccagggtg tgcggagttc tttacaggca ggatctataa 3060
agaagaacaa tgttttgtat tggcattgtt gatgttccaa gcacgcagcg atctatctcc 3120
ggatcctaac aacaaaaata cggattctgt aagaacaag cgcagaaaac ttctgcaacg 3180
aaacctctcg tatatttggg tctgagttgg agaaagatga ccatactact gtatttgggt 3240
gaacttggat tggaaaccga attttgagtt gaaaagcgag tgatcgtata taaatttcag 3300
attcagatta ggatatacta tgagagaagg tagagttacc tgatactaca tactgcccac 3360
caggggtaaa agttgcctcg atggttgtgt ttggagatgg ttccaggcta aatccacaac 3420
gctgaacaaa ttaaaagatg aatggatcaa tcttcaaccc ttacttctgc atttatgagg 3480
attggtcaa ggctctctag a 3501

```

<210> 5

<211> 180

<212> Билор

<213> Linum usitatissimum

<400> 5

```

Met Ala Asp Arg Thr Thr Gln Pro His Gln Val Gln Val His Thr Gln
 1          5          10          15
His His Tyr Pro Thr Gly Gly Ala Phe Gly Arg Tyr Glu Gly Leu
 20          25          30
Lys Gly Gly Pro His His Gln Gln Gly Ser Gly Ser Gly Pro Ser Ala
 35          40          45
Ser Lys Val Leu Ala Val Met Thr Ala Leu Pro Ile Gly Gly Thr Leu
 50          55          60
Leu Ala Leu Ala Gly Ile Thr Leu Ala Gly Thr Met Ile Gly Leu Ala
 65          70          75          80
Ile Thr Thr Pro Ile Phe Val Ile Cys Ser Pro Val Leu Val Pro Ala
 85          90          95
Ala Leu Leu Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Phe Leu Ala Ser Gly Met
100          105          110
Ala Gly Leu Thr Gly Leu Thr Ser Leu Ser Trp Phe Ala Arg Tyr Leu
115          120          125
Gln Gln Ala Gly Gln Gly Val Gly Val Gly Val Pro Asp Ser Phe Glu
130          135          140
Gln Ala Lys Arg Arg Met Gln Asp Ala Ala Gly Tyr Met Gly Gln Lys
145          150          155          160
Thr Lys Glu Val Gly Gln Glu Ile Gln Arg Lys Ser Gln Asp Val Lys
165          170          175
Ala Ser Asp Lys
180

```

<210> 6

<211> 1676

<212> ДНН

<213> Linum usitatissimum

<400> 6

```
tccactatgt aggtcatatc catcatttta atttttgggc accattcaat tccatcttgc 60
ctttagggat gtgaatatga acggccaagg taagagaata aaataatcc aaattaaagc 120
aagagaggcc aagtaagata atccaaatgt acacttgtca tcgcccgaat tagtaaaata 180
cgcgccatat tgtattccca cacattatta aaataccgta tatgtattgg ctgcatttgc 240
atgaataata ctacgtgtaa gcccaasaga acccagctgt agcccatgca aggttaacac 300
tcacgacccc attctcagct ctccactata taaacccacc atccccaatc ttaccaaac 360
caccacacga ctcaaacctc gactctcaca ccttaagaa ccaatcacca ccaaaaaatg 420
gcaaatgtga tgaacctagc agccgtagca acgcagttcc tcttctctgat cgtgtgtggc 480
gcatcgctcc gaaccacagt gattatcgac gaggagacca accaaggccg cgtgtgtggc 540
aaggtggcag ggacagcagc agtctgcgag cagcagatcc agcagcgaga cttctctgag 600
agctgcagc agttcatgtg ggagaaagtc cagaggggag gccacagcca ctattacaac 660
cagggccgtg gaggaggcga acagagccag tacttcgaac agctgtttgt gacgacctta 720
agcaattgag caccgctgtg caccatgcca ggggacttga agcgtgccat cggccaaatg 780
agggcaggaaa tccagcagca gggacagcag caggagcagc agcaggaaat tcagaggttg 840
atccagcaag ctaaacaaat cgctaaggac ctccccggac agtgcgcac ccagcctagc 900
caatgccagt tccagggccg gcagcaatct gcatggtttt gaagggttga tcgattatga 960
gatcgtacaa agacactgct aggtgttaag gatggataat aataataata atgagatgaa 1020
tgtgttttaa gttagtgtaa cagctgtaat aaagagagag agagagagag agagagagag 1080
agagagagag agagagagag agaggctgat gaaatgttat gtatgtttct tggtttttaa 1140
aataaatgaa agcacatgct cgtgtgttcc tatcgaatta ttccggcggt cctgtgtggg 1200
aaagtccaga agggggccg cagctactac tacaaccaag gccgtggagg aggggcaacg 1260
agccagcact tcgatactg ctgcgatgat ctttaagcaat tgaggagcga gtgcacatgc 1320
aggggactgg agcgtgcaat cggccagatg aggcaggaca tccagcagca gggacagcag 1380
caggaaagtg agaggtggtc ccatcaatct aaacaagtgc ctagggaact tccgggacag 1440
tcgggcaccc agcctagccg atgccagctc caggggcagc agcagctctg atgggttttg 1500
agtgtgtatg gatgagatcg tataaagaca ctgctagggt ttaaggatgg gataataaga 1560
tgtgttttaa gtcattaacg gtaataaaaa gagagagagg ctgatgggat gttatgtatg 1620
tatgtttctt ggttttttaa attaaatgga aagcacatgc tcgtgtgggt tctatc 1676
```

<210> 7

<211> 174

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 7

```
Met Ala Lys Leu Met Ser Leu Ala Ala Val Ala Thr Gln Phe Leu Phe
1 5 10 15
Leu Ile Val Val Asp Ala Ser Val Arg Thr Thr Val Ile Ile Asp Glu
20 25 30
Glu Thr Asn Gln Gly Arg Gly Gly Lys Val Ala Gly Thr Ala Ala
35 40 45
Val Cys Glu Gln Gln Ile Gln Gln Arg Asp Phe Leu Arg Ser Cys Gln
50 55 60
Gln Phe Met Trp Glu Lys Val Gln Arg Gly Gly His Ser His Tyr Tyr
65 70 75 80
Asn Gln Gly Arg Gly Gly Gly Glu Gln Ser Gln Tyr Phe Glu Gln Leu
85 90 95
Phe Val Thr Thr Leu Ser Asn Cys Ala Pro Arg Cys Thr Met Pro Gly
100 105 110
Asp Leu Lys Arg Ala Ile Gly Gln Met Arg Gln Glu Ile Gln Gln Gln
115 120 125
Gly Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Glu Val Gln Arg Trp Ile Gln Gln
```


130	135	140
Ala Lys Gln Ile Ala	Lys Asp Leu Pro Gly Gln Cys Arg Thr Gln Pro	
145	150	155 160
Ser Gln Cys Gln Phe	Gln Gly Gln Gln Gln Ser Ala Trp Phe	
165	170	

<210> 8
 <211> 4999
 <212> ДНК
 <213> Linum usitatissimum
 <400> 8

ctcaagcata	cggacaagg	taaataacat	agtcaccaga	acataataaa	caaaaagtgc	60
agaagcaaga	taaaaaaatt	agctatggac	attcaggttc	atatgggaaa	catcattatc	120
ctagtcttgt	gaccatcctt	cctcctgctc	tagttgagag	gccttgggac	taacgagagg	180
tcagttggga	tagcagatcc	ttatcctgga	ctagcctttc	tggtgtttca	gagtcttctg	240
gccgccgtct	acatctatct	ccattaggtc	tgaagatgac	tcttcacacc	aacgacgttt	300
aaggtctcta	tcctactcct	agcttgcaat	acctggcttg	caatacctgg	agcatcgtgc	360
acgagtattg	gatactgtgg	aggagaggtg	tttgctgatt	tagagctccc	ggttgggtga	420
tttgacttcg	atttcagttt	aggcttgttg	aaatttttca	ggttccattg	tgaagccttt	480
agagcttgag	cttctctcca	tgtaaatgcc	ttgatcgaat	tctcctagag	aaaagggag	540
tcgatctctg	agtattgaaa	tcgaagtgc	catttttttt	caacgtgtcc	aatcaatcca	600
caaacaaagc	agaagcagg	taattcttca	tactttatac	gacaagtaat	agtcttaccg	660
tcattgcata	taacgtctcg	ttccttcaag	aggggttttc	cgacatccat	aacgaccoga	720
agcctcatga	aagcattagg	gaagaacttt	tggttcttct	tgtcatggcc	tttatagggtg	780
tcagccgggc	tcgccaattc	ccgtccgact	ggctccgcaa	aatattcgaa	cggcaagtta	840
tggaacttga	accataactc	cacggtattg	agcaggacct	attgtgaaga	ctcatctcat	900
ggagcttcag	aatgtggctg	tcagcaaac	aatgaccgaa	atccatcaca	tgacggagct	960
ccagtggtg	agcgaaacga	aacaggaagc	gcctatcttt	cagagtcgtg	agctccacac	1020
cgaattccgg	caactacgtg	ttgggcaggc	ttcgccgtat	tagagatatg	ttgaggcaag	1080
accatctctg	gccactcgtc	caattacgag	agttgttttt	tttgtgattt	tcctaatgtt	1140
ctcgttgatg	gtgagctcat	attctacatc	gtatggtctc	tcaacgtcgt	ttcctgtcat	1200
ctgatatccc	gtcattttga	tcacactgct	ccgcctcccg	tgccaagtcc	ctaggtgtca	1260
tgacgcgcaa	attgggtgtg	gtgcgggtcg	ccctgtgctt	cttaccgatg	ggttgagggt	1320
gagttttggg	gtctcccgcg	cgatggtagt	gggttgacgg	tttgggtggt	ggtgacggca	1380
ttgatcaatt	tactcttctg	ttcaaatctc	ttggcagaaa	acaattcatt	agattagaac	1440
tgaaaacagg	agtgatgaga	cggattaagt	cagattccaa	cagagttaca	tctcttaaga	1500
aataatgtaa	ccccttttag	ctttatatat	ttgcaattaa	aaaaataatt	taacttttag	1560
actttatata	tagttttta	aactaagttt	aaccactcta	ttattttat	cgaaactatt	1620
tgatgtctc	ccctctaaat	aaacttggt	ttgtgtttac	agaacctata	atcaataaat	1680
caataactca	ctgaagtttg	tgagttta	tgaagggatt	aacggccaaa	atgcactagt	1740
attatcaacc	gaatagattc	acactagatg	gccatttcca	tcaatatcat	cgccgttctt	1800
cttctgtcca	catatccctt	ctgaaacttg	agagacacct	gcacttcatt	gtccttatta	1860
cgtgttcaaa	aatgaaaccc	atgcattccat	gcaaactgaa	gaatggcgca	agaacccttc	1920
ccctccattt	cttatgttgc	gaccatccat	ttcaccatct	cccgtataa	aacaccccca	1980
tcacttcacc	tagaacatca	tcactacttg	cttatccatc	caaaagatac	ccaccatggc	2040
tagatcatca	agccctttgc	ttctctcact	ctgcattttc	gccattctct	tcactctctc	2100
ctcgggtagg	cagcaatttc	agcaggggaa	cgagtgccag	atcgacagga	tcgacgcctc	2160
cgaagccggc	aaaaccatcc	aggcagaagc	tgccaccatc	gaggtatggg	accagaaccg	2220
ccagcaattc	cagtgcgtcg	gtgttgccgt	tgtaaggcgc	accattgagc	ccaaaggctc	2280
ttctcttgcc	ttctacagca	acacccctca	gtcatctac	atcgttcaag	gtataaatta	2340
aatcagttca	tacaatgata	accaccactt	cgaatgtatt	tatcaaatat	caatgatcga	2400
tgacactgta	tgtgttgtgt	atattcaggt	aggggagtta	caggaaatcat	gttccackga	2460
tgtccagaga	catttcgagga	atcccagcag	caaggacaac	agggccaaca	gggtagtctc	2520
caagaccagc	accagaagat	ccgcccgttc	cgtgaagggtg	acgtcattgc	cgtccctgcc	2580
ggtgtagccc	actggtctca	caacgatggc	aacgaaccag	tcattggccat	tggtgtccat	2640
gacacttcca	gccacctcaa	ccaactggac	aacaacccca	gggtatataa	gcattggcgt	2700
agttgtcaat	aaattgcaca	caattgggac	tctattttca	gtatcttaata	actttttcct	2760
tttttggcag	aaactctact	tggcaggaaa	cccagagagc	gagttcgaa	aatcgagca	2820
aggagggcag	ctgagccgtg	gggagagtg	aggtggacga	ggacgcagg	aacctcttca	2880
acctgcaaca	acctctctct	gcggaatcga	ctccaagctc	atcgccgagg	cgttcaatgt	2940
cgacgagaac	gtggcaagg	ggctacagag	cgagaacgac	aacagaggcc	agatcgtccg	3000

```

agtcgaaggc gagctcgaca tegtcagacc tccgaccagt atccaggagg agtcacagga 3060
gcaggagggt cgtgggtggt gccgctacta ctccaatgga gtggaggaga ccttctgctc 3120
catgagacta attgagaaca tcggcgatcc ttctcgggca gacattttca ctccagaagc 3180
cgcccgcggt agatccctca acagccacaa cctcccgtc ctgcaatgga tccagcttag 3240
cgccgagaga ggcgttctct acaatgtata gatctcactc acgcaccaac tctaaattga 3300
atccctaatt atttaattca ccgatatctg accgaccggt ttgaattttg taggaagcga 3360
tcaggctgcc gcactgggaa atcaacgcac acagcatagt gtacgcgac agaggacaa 3420
ccagagtcca gatcgtgaac gaggaaggga attcgggtgt cgtggagtgt ctgcaggaa 3480
gacagggtgt gacgggtccc cagaacttcg cgggtgtaaa gagatcccag agcgagaggt 3540
ttgagtggtt ggcgttcaag accaacgaca acgcgatggt gaactcgcta gccgggagga 3600
catcggcagt aagggcgatc cccgcggatg tactggctaa cgcctggagg gtgtcggcgg 3660
aggaggcgag gagggtgaag ttcaacaggg agggagactca cttgggtagc accagggggc 3720
agtcagggtt gcccgggagg ttgaatgtcg tcaaggaggt gatcaacttg cttatgtaaa 3780
atgtgacggt gaaataataa cggtaaaata tatgtataaa taataataat aaagccacaa 3840
agtgagaatg aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg 3900
tatcgtattg tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgtttttt aaatcatgaa 3960
ttttaaatc tataaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatata catggatgtt 4020
tctttacca aatctagttc ttgagaggat gaagcatcac cgaacagttc tgcaactatc 4080
cctcaaaagc tttaaaatga acaacaagga acagagcaac gttccaaaga tcccaaacga 4140
aacatattat ctatactaact actatattat taattactac tgcccggaa cacaatccct 4200
gaatgatccc tattaactac aagccttgtt ggcggcgagg aagtgatcgg cgcggcgaga 4260
agcagcgagc tcggagacga ggccttggat gagcagagtc tttacctgcc agggcgtaga 4320
ggggaagagc ggccttctgg agtaggagtt cagcaagcgg cggttccttg gccggtaga 4380
cgacgtaag ggtggntgtc gacgtcmtcg ttctngagg cgnattcatg aaggggttaa 4440
gtcanatctg tagctctcga gtgtcaggg agccnaaaga cgttgggaaa cgtcgcngct 4500
ttggggcacc agtcngcggg gcacgcttcc ctectgctgc tccanaancn angtanattt 4560
aaaaganatg ggaaattaan taatggnaat nannaggagg attgnaacgg tcngancn 4620
anganagtt ttannggtt taaatactgg gggagtngna gccngccnct ggttccngtg 4680
tagangaaac caagnnccgg gaggtttnc nnnngnagg agaaaaagga nncatttnan 4740
nangcngagg gacatgaanc ggtacngagc tngggttcan nnancggcgn mnggnagtec 4800
cnngggaccn ggntggggtt anaagggaan ggaacattng gtngnangga naanaccntt 4860
ttacnattgc ctttgcaagg nngtntnggc ncntnccggc nacatnccgc tgcattgggt 4920
ttggggngcc nanaggnagc cncangggna nncngccncc ttgtncangn cgctnaagtt 4980
cnattgtana tggncgttg 4999

```

<210> 9

<211> 96

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 9

```

Met Ala Arg Ser Ser Ser Pro Leu Leu Leu Ser Leu Cys Ile Phe Ala
1 5 10 15
Ile Leu Phe His Ser Ser Leu Gly Arg Gln Gln Phe Gln Gln Gly Asn
20 25 30
Glu Cys Gln Ile Asp Arg Ile Asp Ala Ser Glu Pro Asp Lys Thr Ile
35 40 45
Gln Ala Glu Ala Gly Glu Val Trp Asp Gln Asn Arg Gln Gln Phe Gln
50 55 60
Cys Ala Gly Val Ala Val Val Arg Arg Thr Ile Glu Pro Lys Gly Leu
65 70 75 80
Leu Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Thr Pro Gln Leu Ile Tyr Ile Val Gln
85 90 95

```

<210> 10

<211> 85

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 10
 Gly Arg Gly Val Thr Gly Ile Met Phe Pro Xaa Cys Pro Glu Thr Phe
 1 5 10 15
 Glu Glu Ser Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Gly Ser Ser Gln
 20 25 30
 Asp Gln His Gln Lys Ile Arg Arg Phe Arg Glu Gly Asp Val Ile Ala
 35 40 45
 Val Pro Ala Gly Val Ala His Trp Ser Tyr Asn Asp Gly Asn Glu Pro
 50 55 60
 Val Met Ala Ile Val Val His Asp Thr Ser Ser His Leu Asn Gln Leu
 65 70 75 80
 Asp Asn Asn Pro Arg
 85

<210> 11

<211> 165

<212> Билор

<213> Linum usitatissimum

<400> 11

Asn Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Pro Arg Asp Glu Phe Glu Gln Ser Gln
 1 5 10 15
 Gln Gly Gly Arg Leu Ser Arg Gly Glu Ser Glu Gly Gly Arg Gly Arg
 20 25 30
 Arg Glu Pro Leu Gln Pro Ala Thr Thr Ser Ser Cys Gly Ile Asp Ser
 35 40 45
 Lys Leu Ile Ala Glu Ala Phe Asn Val Asp Glu Asn Val Ala Arg Arg
 50 55 60
 Leu Gln Ser Glu Asn Asp Asn Arg Gly Gln Ile Val Arg Val Glu Gly
 65 70 75 80
 Glu Leu Asp Ile Val Arg Pro Pro Thr Ser Ile Gln Glu Glu Ser Gln
 85 90 95
 Glu Gln Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Tyr Tyr Ser Asn Gly Val Glu
 100 105 110
 Glu Thr Phe Cys Ser Met Arg Leu Ile Glu Asn Ile Gly Asp Pro Ser
 115 120 125
 Arg Ala Asp Ile Phe Thr Pro Glu Ala Gly Arg Val Arg Ser Leu Asn
 130 135 140
 Ser His Asn Leu Pro Val Leu Gln Trp Ile Gln Leu Ser Ala Glu Arg
 145 150 155 160
 Gly Val Leu Tyr Asn
 165

<210> 12

<211> 141

<212> Билор

<213> Linum usitatissimum

<400> 12

Glu Ala Ile Arg Leu Pro His Trp Asn Ile Asn Ala His Ser Ile Val
1 5 10 15

Tyr Ala Ile Arg Gly Gln Ala Arg Val Gln Ile Val Asn Glu Glu Gly
20 25 30

Asn Ser Val Phe Asp Gly Val Leu Gln Glu Gly Gln Val Val Thr Val
35 40 45

Pro Gln Asn Phe Ala Val Val Lys Arg Ser Gln Ser Glu Arg Phe Glu
50 55 60

Trp Val Ala Phe Lys Thr Asn Asp Asn Ala Met Val Asn Ser Leu Ala
65 70 75 80

Gly Arg Thr Ser Ala Val Arg Ala Ile Pro Ala Asp Val Leu Ala Asn
85 90 95

Ala Trp Arg Val Ser Pro Glu Glu Ala Arg Arg Val Lys Phe Asn Arg
100 105 110

Gln Glu Thr His Leu Ala Ser Thr Arg Gly Gln Ser Arg Ser Pro Gly
115 120 125

Arg Leu Asn Val Val Lys Glu Val Ile Asn Leu Leu Met
130 135 140

<210> 13

<211> 11

<212> Білок

<213> Linum usitatissimum

<400> 13

Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln
1 5 10

<210> 14

<211> 18

<212> ДНК

<213> Синтетична послідовність

<220>

<223> Опис синтетичної послідовності: праймер

<400> 14

tccactatgt aggtcata

18

<210> 15

<211> 18

<212> ДНК

<213> Синтетична послідовність

<220>

<223> Опис синтетичної послідовності: праймер

<400> 15

ctttaagggtg tgagagtc

18

<210> 16

<211> 15

<212> ДНК

<213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 16
 aggggtgatc gatta 15
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 17
 gatagaaccc acacgagc 18
 <210> 18
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 18
 tatctagact caagcatatcg gacaagggt 29
 <210> 19
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: сайтXbaI
 <400> 19
 tctaga 6
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 20
 gggttatcatt gtatgaactg a 21
 <210> 21
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: сайт NcoI
 <400> 21
 ccattgg 6
 <210> 22
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність

<220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 22
 gcaagcttaa tctgacggtg aaataataac gg 32
 <210> 23
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: сайт HindIII
 <400> 23
 aagctt 6
 <210> 24
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: праймер
 <400> 24
 taggtacctg gcaggtaaag actctgctc 29
 <210> 25
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Синтетична послідовність
 <220>
 <223> Опис синтетичної послідовності: сайт KpnI
 <400> 25
 ggtaac 6

1 ttcaaaaccgattccccagggcgccctattgaagatatgggggaagttcgacgagatcgatgtcgggtcgagtgctatg 80
 81 gtgatgggtgccgtttggggggaggatgagcgagatagccaagactagcattccgttcccacacagagttgggaatttgta 160
 161 ccaaatcccaacacttgtcgtattgagcgacgtagggacgcggaaaaacacatccgttgatcagggagttgtacgatg 240
 241 atctcgagccttatgtgtcgaagaatccgaggtatgcttacgtgaactacagggatctcgacatcgggatgaatggagga 320
 321 ggtgaaggggatgagaaggggtacttatggtgaggctaaaggtgtggggggagaagtactttgggtcaactttgatcggtt 400
 401 ggttcgggtgaagacgattgttgatcccaataatgtgtttcgaaacgagcagagcattccctcaattccaactcggttat 480
 481 aaggatcaatgatcaatgagaattttctcttccaatgtgattacaagttctattgggtcagctttctcaactgctctat 560
 561 tcatttagattaattcataacaactattaatttaccagccttttatccggcccggttgccgatattattttcttaagtttt 640
 641 agatgaatgaaccgatttagtttttattgagatgagattaatctttaatttgcttgaatttactcacggttgatgtga 720
 721 tatttgaatttaactaaaatgataaatatcgataaaaaataaaatatttataataataacataaagaacaata 800
 801 aaataaataaatttatttatttatttcttctgtttcttctgtatcatcatctctcttcttacttcttaaggctt 880
 881 ttcaattatcacttaattaaatagataaatcgtaattctataacatttaacctatacacttgcacggtgaacaaat 960
 961 caatgatgataataataataataataataattcaattatatactacaatttttaattataaagtttatgcggtcagtt 1040
 1041 tctgcaagctccgagctccttgcattcgttagttttctgcggtctcaaggtataacgactcggagcgacgagcccttgc 1120
 1121 tccaatggacgggttgcatttctgcgctcgttgagctcgattggcgtgtcatgctggagtcagagttcctacaaaaaac 1200
 1201 cctaaactagaggtgattaggggtgaaataggggtgtggcctgggtccattgtccaagtttttagtcaacttaaaac 1280
 1281 agacttaaatatttcttccaaatagtttatctgttattatattagcgtgtaattagtccttgacaatggggccggacgg 1360

1 tctagacatttgacataaaccgaatttcasagaacacacattgactaacacacaaagaastagtagtgaaatttggg 80
R1
81 agattaaaaatagaacaaactgattcttagaagaagagatgattaggtgctttcagttcggctctgacaggaaatcga 160
R2
161 gatgttcaacttatttcattgtcgattcatctcccaattgtcctgggtcctttactgtcogacgcttttttgaaatccag 240
R3
241 ttaattcccatcaagttcttcttcagctgctagcactgctagctccaacatggagcgtggagctactcgttcatgggg 320
321 catcgcaagggtttgcttctgttctgtaccagccagcgcacccgcctcttgggtgtgtgacaattcggtgaagc 400
401 gcgcaagttgacatcccatagctcgcacactcccatatggatgtttaaaccgtatatcacgagtcgcatctacatgtc 480
481 ccacacacacacataaaagcaatagtttgggagcttttcataattgaaacgggcattgacgacttgccctctcgataat 560
561 ttaactctttttctcttcagctgattgtgtgcattccgggctcagaagcacatcaaagggatctctccatcgtagt 640
641 attgggtcgtgtcgtatgatacgaagcagtcgatgaagtttccctaatgtgcgagctacaggctccgcaagaacccgcga 720
721 ggtagatcgtatgctagtacccaaaaatcagtttgcgtagcggaaatcaacactagagactcaccctaatgcatctcatg 800
801 tgtgatgaacagtttatcatttgtgagcttaggggtcattgtcgatgacccaatgcacattgagcttatgataaatttg 880
R3
881 aatagggaagcgttttccacccagatcagaatagctaccccttttccggcgccaaattccggcctcctatcttccacc 960
961 acaacttaaaagatgcgatcggtaaggaaactcaccgaccacacacatgaataatcttcgggtgacgggttccgtgtgatca 1040
1041 agtccctcaatttctcctcaacctagcttcaatcgccgctagcgttatccccgcataatggactttcatagcgcggagcgt 1120
1121 agccgggagcagcagcgaagaaggatgagcggcgagattcggttaagaagaacgagcttccgtcctgtctatggag 1200
1201 gcagatttctgagttgatggtgatggaatttgtgatgtgacacttttaatttaagttgatttttagcacttcattcacg 1280
1281 taattaaataaataatttccagttatttatattttcttactgttatctaattttttgaaagattaaaacttttgatat 1360
R4 R2

Фир. 2-1

1361 aggcagatcatgacacgtcgaagtttaagtgaatgagactcctaacaaggtaataacaaagcagttcataaagcgaatga 1440
R1
1441 ccttgatctttactaagcttgagatcattgaacatataaattaaatcgtttaatgaagataagaactttaataaaaaat 1520
R4
1521 cattcaaaacgagaaactgataacaaaaacaaagcaaacggccaacaaataatagacggtggaaggatgatgcagagcc 1600
R5
1601 atccacccctttttccagtttcttactgttacttctctatgcataatcacaagacgcccgtgaaactgttagtcatg 1680
R5
1681 cagagcccttactcgcaggtcaccgcaccacgtgttactctatcacttctcctccttctcctttaagaaccaccacgc 1760
1761 caccctccctctcacaacactcataaaaaaacacctcttgcatttctcccaagttcaaatttagttcacagctaagcaag 1840
1841 aactcaacaaca ATG GCG GAT CGT ACA ACA CAG CCA CAC CAA GTC CAG GTC CAC ACC CAG CAC 1903
1 M A D R T T Q P H Q V Q V H T Q H 17
1904 CAC TAT CCC ACC GGC GGG GCT TTC GGC CGT TAT GAA GGT GGA CTC AAA GGC GGT CCA CAT 1963
18 H Y P T G G A F G R Y E G G L K G G P H 37
1964 CAC CAG CAA GGA TCA GGC AGC GGC CCA TCA GCT TCC AAG GTG TTA GCA GTC ATG ACC GCG 2023
38 H Q Q G S G S G P S A S K V L A V M T A 57
2024 CTC CCC ATC GGC GGG ACC CTC CTT GCC TTG GCC GGG ATA ACC TTG GCT GGG ACG ATG ATC 2083
58 L P I G G T L L A L A G I T L A G T M I 77
2084 GGG CTG GCG ATC ACC ACC CCG ATT TTT GTC ATC TGC AGC CCT GTT CTA GTC CCG GCC GCT 2143
78 G L A I T T P I F V I C S P V L V P A A 97
2144 CTG CTC ATC GGG TTT GCC GTG AGC GCG TTT CTG GCC TCG GGG ATG GCC GGG CTG ACA GGG 2203
98 L L I G F A V S A F L A S G M A G L T G 117
2204 CTG ACC TCG CTG TCG TGG TTT GCG AGG TAT CTG CAG CAG GCT GGG CAG GGA GTT GGA GTG 2263
118 L T S L S W F A R Y L Q Q A G Q G V G V 137
2264 GGG GTG CCG GAT AGT TTC GAG CAG GCG AAG AGG CGC ATG CAG GAT GCT GCT GGG TAT ATG 2323
138 G V P D S F E Q A K R R M Q D A A G Y M 157

Фир. 2-2

Fig. 4-1

Fig. 4-2

Fig. 4-3

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
ACAGCCACAACCTCCCGCTCTGCAATCCAGTTCAGCTTAGCGCGAGAGGGCGTTCTCTACAAATgtatagatctcactcaagcaccactctaaattga
N S H N L P V L Q W I Q L S A E R G V L Y N

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
atccctaattatttaattcaccgatctctgaccgaccggtttgaattttgtagGAAGCGATCAGGCTGCCGCACTGGAACATCAACGCACACAGCATAGT
E A I R L P H W N I N A H S I V

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
GTACGCCATCAGAGGACAAGCCAGAGTCCAGATCGTGAACGAGGAAGGAATTCGGTGTTCGATGGAGTGTCTGAGGAAGGACAGGTGGTGACGGTGCCG
Y A I R G Q A R V Q I V N E E G N S V F D G V L Q E G Q V V T V P

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
CAGAACTTCGGGTGGTAAAGAGATCCAGAGCGAGAGTTTGAAGTGGGTGGCGTTCAAGACCAACGACAAACGCGATGGTGAACCTCGTAGCCGGGAGGA
Q N F A V V K R S Q S E R F E W V A F K T N D N A M V N S L A G R

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
CATCGGCAGTAAGGGCGATCCCGCGGATGTACTGGCTAACGCCCTGGAGGGTGTGCGCGGAGGAGGCGAGGAGGGTGAAGTTCAACAGGCAGGAGACTCA
T S A V R A I P A D V L A N A M R V S P E E A R R V K F N R Q E T H

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
CTTGCTAGCACCAGGGCCAGTCCAGGTGCGCCCGGAGGTTGAATGTCTCAAGGAGGTGATCAACTTGTCTTATGTAAaatgtgacggtgaaataataa
L A S T R G Q S R S P G R L N V V K E V I N L L H *

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
cggtaaaatstatgttaataataataataaagccacaaagtgaagaatgaggggaaggggaatgtgtaatgagcagtagccggtggtgctaattttg
tatcgattgtcaataaatcatgaattttgtggtttttatgtgttttttaaatcatgaatttttaattttataaaataatctccaatcgaagaacaac

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
attccatatccatggatgtttctttaccacaaatctagtcttgagagatgaagcatcaccgaacagttctgcaactatccctcaaaagctttaaaatgs

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
acaacaagggaacagacgaacgttccaaagatcccaaaagaacatatctctataactataattatttaattactactgcccgaatcaccaatccct

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200

Фир. 4-4

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
gaatgatttcctatttaactacaagccttgttggcggcgagaaagtgatcggcgcgcgagaaagcagcggactcggagacgaggccttggatgagcagagtc

4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
tttacctgccagggcggtgaaggggaagagcgccctctcggagtaggagttcagcaagcggcggttcccttggcggagtaagcggacgttaaggggtggnatg

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
gacgtentcgtttcnggagggcgnattcatgaaggggttaaagtcanatctgtagctctcagagtgctcagggagcnaaagacgttgggaaccgtcgncgt

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
ttggggcatcagtcngcggggcagcgttccctcctgctgctccanaancnangtanatttaaaaganatgggaaattaantaatggnaatnannaggagg

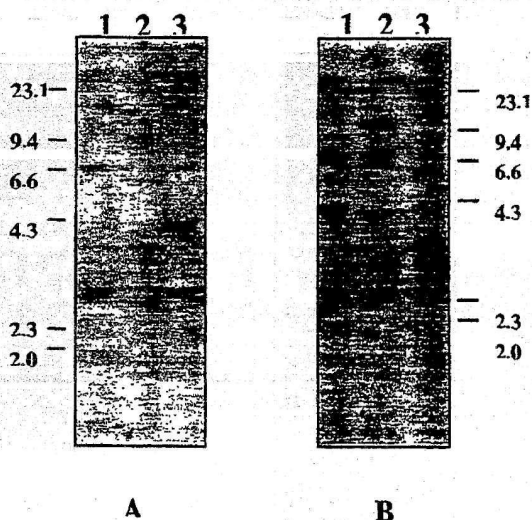
4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
attgnaacggtcngancngnangaanagtttttannngtllaaatactggggagtgngagccngcncctgggttcngtgtagangaaaccaagnnccgg

4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
gaggnnttcannnnngnagggaagaaaggganncattnnannngcngagggacatgaancggtacngagctgngggtcannnnanccggcgnnnngnagtc

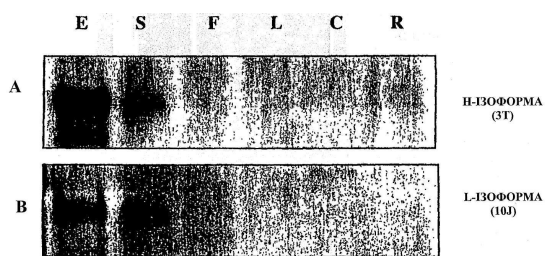
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
cnngggacnnggntgggtgnanaaggggaanggaacattnggtngnanggganaanaocnttttacnattgcctttgcaggnhngntnggncntncgggt

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990
nacatncgcgtgcattggggtttgggngccnanaaggnagccncannggnannncngcnccttgtnancngcgtnaagttcnattgtanatggncgttg

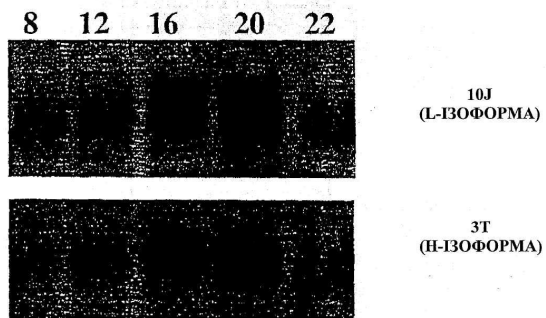
Фир. 4-5



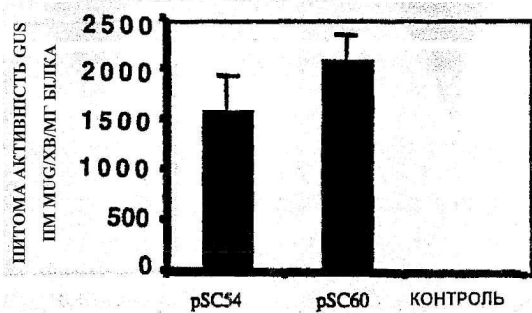
Фир. 5



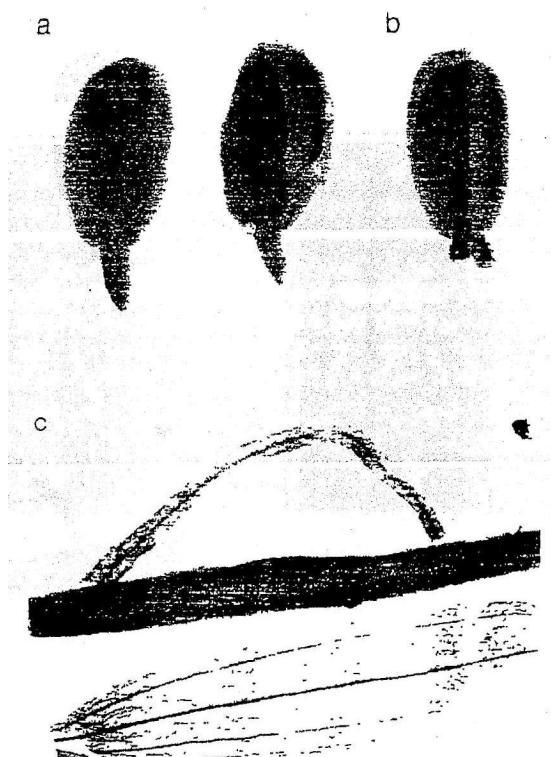
Фиг. 6



Фиг. 7



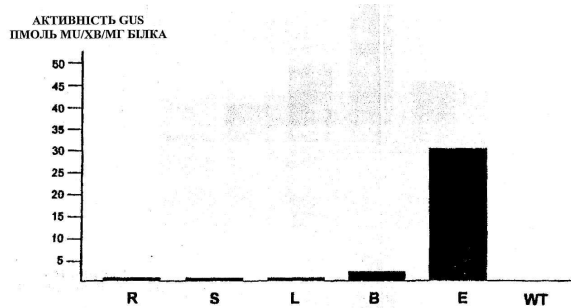
Фиг. 8



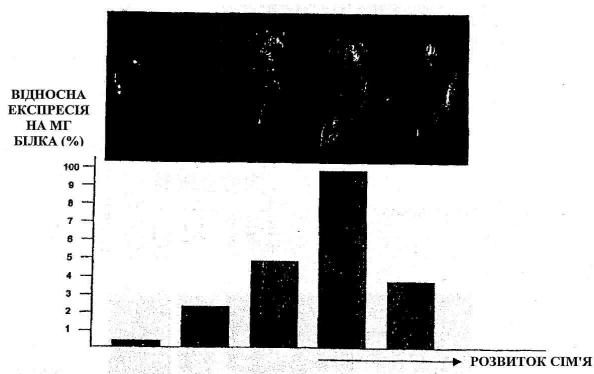
Фиг. 9.1



Фиг. 9.2

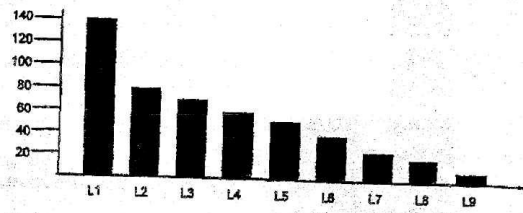


Фиг. 10

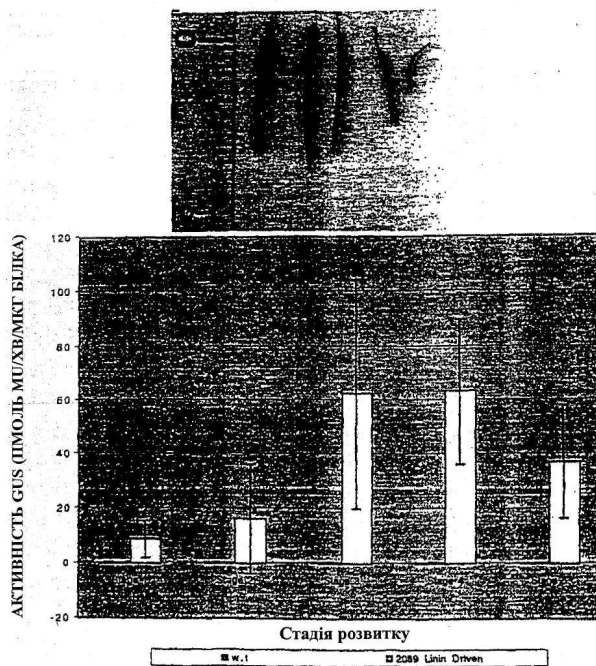


Фіг. 11

АКТИВНІСТЬ GUS
ПМОЛЬ МУ/ХВ/МГ БІЛКА



Фіг. 12



Фіг. 13