



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85528** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**A01H 5/00**  
**C12N 15/09**  
**C12N 15/55**  
**C12N 15/82**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ДНК, ЩО КОДУЄ РОСЛИННУ ЛІПАЗУ, ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ ТА СПОСІБ КОНТРОЛЮ СТАРІННЯ У РОСЛИН**

1

2

(21) 2003010421  
(22) 19.06.2001  
(24) 10.02.2009  
(86) PCT/US01/19385, 19.06.2001  
(31) 09/597,774  
(32) 19.06.2000  
(33) US  
(31) 09/610,104  
(32) 05.07.2000  
(33) US  
(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.  
(72) ТОМПСОН ДЖОН Е., ВОНГ ТЗАНН-УЕЙ, ХУ-ДАК КАТАЛІНА, ХОНГ ЮБЕН  
(73) СЕНЕСКО ТЕХНОЛОДЖІЗ, ІНК.  
(56) WO0049164, 24.08.2000  
DATABASE EMBL [Online] 6 January 1999 (1999-01-06) "Dianthus caryophyllus lipase mRNA, partial cds." Database accession no. AF026480 XP002143322 -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 May 1999 (1999-05-01) "Lipase (Fragment)." Database accession no. Q9ZTW1 XP002211628 -& HONG, Y., ET AL.: "An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA), vol. 97, no. 15, 18 July 2000 (2000-07-18), pages 8717-8722, EP1033405, 06.09.2000  
DATABASE GENESEQ [Online] 17 October 2000 (2000-10-17) "Arabidopsis thaliana DNA fragment SEQ ID NO: 25113." Database accession no. AAC39568 XP002211629 -& DATABASE GENESEQ [Online] 17 October 2000 (2000-10-17) "Arabidopsis thaliana protein fragment SEQ ID NO: 25115." Database accession no. AAG22257  
DATABASE GENESEQ [Online] 18 October 2000 (2000-10-18) "Arabidopsis thaliana DNA fragment SEQ ID NO: 57315." Database accession no. AAC48392 XP002211631 -& DATABASE GENESEQ [Online] 18 October 2000 (2000-10-18) "Arabidopsis thaliana protein fragment SEQ ID NO: 57317." Database accession no. AAG45635  
DATABASE EMBL [Online] 3 June 1997 (1997-06-03) "Arabidopsis thaliana chromosome 2 BAC T6B20

genomic sequence, complete" Database accession no. U93215 XP002211633 -& DATABASE SWISSPROT [Online] 1 July 1997 (1997-07-01) "Putative lipase" Database accession no. O04340 DATABASE EMBL [Online] 14 June 2000 (2000-06-14) "AB06H06 AB Arabidopsis thaliana cDNA 5' similar to lipase, mRNA sequence." Database accession no. BE038788  
THOMPSON JOHN E ET AL: "Lipid metabolism during plant senescence." PROGRESS IN LIPID RESEARCH, vol. 37, no. 2-3, July 1998 (1998-07), pages 119-141,  
DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; December 2000 (2000-12) THOMPSON J ET AL: "Altered membrane lipase expression delays leaf senescence." Database accession no. PREV200100186359 XP002211660 & BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 28, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 775-777  
BROWN J H ET AL: "MOLECULAR SPECIES SPECIFICITY OF PHOSPHOLIPID BREAKDOWN IN MICROSOMAL MEMBRANES OF SENESCING CARNATION FLOWERS" PLANT PHYSIOLOGY, ROCKWILLE, MD, US, vol. 85, no. 3, 1987, pages 679-683,  
BURGER L ET AL: "RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN MEMBRANE PERMEABILITY, RESPIRATION RATE, ACTIVITIES OF LIPASE AND PHOSPHOLIPASE C AND ULTRASTRUCTURE IN SENESCING PETALS OF DIANTHUS CARYOPHYLLUS (CV. WHITE SIM)" SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY - SUID-AFRIKAANS TYDSKRIFT VIR PLANTKUNDE, FOUNDATION FOR EDUCATION, SCIENCE AND TECHNOLOGY, PRETORIA,, SA, vol. 52, no. 3, 1986, pages 195-200,  
HUANG A: "Plant Lipases" PLANT LIPASES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, 1984, pages 419-442,  
(57) 1. Виділена молекула ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, у якій молекула ДНК гібридизу-

(13) **C2**

(11) **85528**

(19) **UA**

ється за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома.

2. Виділена молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що молекула ДНК має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1.

3. Виділена молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що виділена молекула ДНК кодує інформацію про амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4.

4. Виділена молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що молекула ДНК має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:18.

5. Виділена старіння-індукована ліпаза, кодована нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома.

6. Старіння-індукована ліпаза за п. 5, яка **відрізняється** тим, що ліпаза має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2.

7. Вектор для трансформації рослинних клітин, який включає

(а) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини одного ланцюга молекули ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, і

(б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, що антисмислові нуклеотидні послідовності експресуються у рослинній клітині, до якої він трансформується.

8. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають промотор та ділянку термінації транскрипції.

9. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають конститутивний промотор.

10. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають рослинний тканиноспецифічний промотор.

11. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають старіння-індукований рослинний промотор.

12. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають вірусний промотор.

13. Вектор за п. 7, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають конститутивний промотор.

14. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид, що кодує молекулу РНК, яка є по суті комплементарною до відповідної частини РНК-транскрипта рослинного гена старіння-індукованої ліпази, у якому зазначений рослинний ген гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома.

15. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де олігонуклеотид чи полінуклеотид включає від приблизно шести до приблизно 100 нуклеотидів.

16. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де кодуюча ділянка рослинного гена має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1.

17. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де кодуюча ділянка рослинного гена має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:18.

18. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де рослинний ген є геном гвоздики.

19. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де рослинний ген є геном *Arabidopsis*.

20. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де рослинний ген є геном томата.

21. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де рослинний ген є геном овочевої квасолі.

22. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14, де антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид є по суті комплементарним до відповідної частини 5'-некодуючої ділянки РНК-транскрипта.

23. Вектор, який включає:

(а) молекулу ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, у якій молекула ДНК гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, і

(б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з молекулою ДНК таким чином, що молекула ДНК експресується у рослинній клітині, до якої він трансформується.

24. Бактеріальна клітина, трансформована вектором за п. 23, де вектор міститься всередині клітини.

25. Рослинна клітина, трансформована вектором за п. 7, де вектор міститься всередині клітини.

26. Рослина або її потомство, одержані з рослинної клітини, трансформованої вектором за п. 7, де вектор міститься всередині клітини.

27. Рослина, частина рослини або її потомство за п. 26.

28. Спосіб інгібування експресії ендогенної старіння-індукованої ліпази у рослині, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає:

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини одного ланцюга молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або відповідної частини РНК-послідовності, кодованої геном вказаної ендогенної старіння-індукованої ліпази, і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, щоб відбувалася експресія антисмислових нуклеотидних послідовностей, і

(2) вирощування вказаної рослини, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються та зв'язуються з вказаною РНК-послідовністю, інгібуючи цим експресію вказаного гена старіння-індукованої ліпази.

29. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що відповідна частина ДНК чи відповідна частина РНК, до якої антисмисловий оліго- чи полінуклеотид є по суті комплементарним, включає 5'-некодуючі послідовності.

30. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказане інгібування спричинює зміну процесу старіння рослини.

31. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказане інгібування спричинює підвищену стійкість вказаної рослини до старіння, індукованого середовищним стресом.

32. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказане інгібування спричинює збільшення біомаси вказаної рослини.

33. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказане інгібування спричинює збільшення врожаю насіння у вказаної рослини.

34. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають конститутивний промотор, що виявляє активність у рослині.

35. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають подвійний промотор 35S.

36. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають тканиноспецифічний промотор, що виявляє активність у рослині.

37. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають старіння-індукований промотор, що виявляє активність у рослині.

38. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказану рослину вибирають з групи, що складається з плодоносних рослин, квіткових рослин, овочів, сільськогосподарських культур та лісових видів.

39. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що рослина є томатом.

40. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що рослина є гвоздику.

41. Спосіб інгібування експресії ендогенного гена чи генів старіння-індукованої ліпази у рослинній клітині, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає:

(А) виділену молекулу ДНК, що кодує екзогенну старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК гібридується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з молекулою ДНК таким чином, щоб забезпечити експресію кодованої нею екзогенної старіння-індукованої ліпази, і

(2) вирощування вказаної рослини, причому відбувається надекспресія вказаної молекули ДНК, і ген чи гени ендогенної старіння-індукованої ліпази інгібуються екзогенною старіння-індукованою ліпазою.

42. Спосіб за п. 41, який **відрізняється** тим, що регуляторні послідовності включають конститутивний промотор.

43. Спосіб зміни вікового старіння та старіння, зв'язаного із середовищним стресом, у рослини, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає:

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини одного ланцюга молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК,

що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або щонайменше частини РНК-послідовності, кодованої геном вказаної ендогенної старіння-індукованої ліпази, і (Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, щоб відбувалася експресія антисмислових нуклеотидних послідовностей, і

(2) вирощування вказаної рослини, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються та зв'язуються зі вказаною РНК-послідовністю, інгібуючи цим експресію вказаного гена старіння-індукованої ліпази.

44. Трансгенна рослинна клітина, яка включає вектор за п. 7.

45. Трансгенна рослинна клітина, яка включає вектор за п. 23.

46. Плазмідна, яка включає систему реплікації, функціональну у прокаріотному хазяїні, та антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14.

47. Плазмідна, яка включає систему реплікації, функціональну у *Agrobacterium*, та антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид за п. 14.

48. Рослина або її потомство, які відрізняються тим, що вказана рослина походить з клітини, що має інгібовану чи знижену експресію старіння-індукованої ліпази, причому зазначена клітина включає вектор за п.7.

49. Рослина або її потомство, у якій рослина походить з клітини, що має інгібовану чи знижену експресію старіння-індукованої ліпази, причому зазначену клітину одержують шляхом

(1) введення до геному клітини вектора, який включає:

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини однієї нитки молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, вказаної ендогенної старіння-індукованої ліпази, і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, щоб забезпечити експресію антисмислових нуклеотидних послідовностей, і

(2) вирощування вказаної клітини, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються та зв'язуються з вказаною РНК-послідовністю, інгібуючи цим експресію вказаного гена старіння-індукованої ліпази.

50. Рослина або її потомство за п. 49, де рослина є томатом.

51. Рослина або її потомство за п. 49, де рослина є гвоздику.

52. Спосіб інгібування старіння насіння, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає:

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини одного ланцюга молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому ДНК, що кодує

вказану ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або відповідної частини РНК-послідовності, транскрибованої з молекули ДНК, що кодує вказану ендогенну старіння-індуковану ліпазу, і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями, і

(2) вирощування вказаної рослини та одержання з неї насіння, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються та зв'язуються з вказаною РНК-послідовністю, а експресія вказаного гена старіння-індукованої ліпази інгібується.

53. Спосіб підвищення врожаю насіння у рослини, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає:

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до відповідної частини одного ланцюга молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому ДНК, що кодує вказану ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридизується за умов високої жорсткості з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або комплементарні до відповідної частини РНК-послідовності, транскрибованої з молекули ДНК, що кодує вказану ендогенну старіння-індуковану ліпазу, і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями, і

(2) вирощування вказаної рослини та одержання з неї насіння, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються та зв'язуються з вказаною РНК-послідовністю, а експресія вказаного гена старіння-індукованої ліпази інгібується.

Ця заявка часткове продовженням заявки реєстр. №09/597774, яка частково доповнює заявку реєстр. №09/250280, яка є частковим продовженням заявки реєстр. №09/105812, поданої 26 червня 1998р., повністю включених до цього документу як посилання.

Даний винахід стосується полінуклеотидів, що кодують, рослинні поліпептиди і здійснюють старіння-індуковану експресію, трансгенних рослин, що містять полінуклеотиди у антисмисловій орієнтації, та способів за контролем старіння у рослин. Конкретніше, даний винахід стосується генів рослинної ліпази, експресія яких індукується початком старіння, та застосування гена ліпази для контролю старіння у рослин.

Старіння є кінцевою фазою біологічного розвитку у житті рослини. Воно призводить до смерті і відбувається на різних рівнях біологічної організації, включаючи рослину у цілому, органи, квітки та плоди, тканини та окремі клітини.

Ранньою і фундаментальною ознакою старіння є погіршення стану клітинної мембрани. Метаболізм ліпідів, зокрема мембранних ліпідів, є одним з декількох біохімічних виявів клітинного старіння. Наприклад, у пелюстках рози по мірі прогресування старіння відбувається збільшення активності ацилгідролази, яке супроводжується втратою мембранної функції [Borochov et al., *Plant Physiol.*, 1982, 69, 296-299]. Погіршення стану клітинних мембран є ранньою та характерною ознакою старіння, яка призводить до підвищення проникності, втрати іонних градієнтів та зниження функції ключових мембранних протеїнів, таких як іонні помпи [Brown et al., *Plant Physiol.: A Treatise*, Vol.X, Academic Press, 1991, pp.227-275]. Переважно таке погіршення структурної та функціональної цілісності мембрани може бути віднесено на рахунок ліпаза-медіованого метаболізму фосфоліпідів. Для старіючих квіткових пелюстків, листів, сім'ядоль та достигаючих плодів було продемонстровано втрату ліпідного фосфату [Thompson J.E., *Senescence and Aging in Plants*, Academic Press, San Diego, 1988, pp.51-83], яка, можливо, спричинює значні зміни молекулярної організації мем-

бранного бішару з розвитком старіння, які приводять до порушення клітинної функції. Зокрема, дослідження певних старіючих рослинних тканин дали свідчення про розділення ліпідної фази у мембранах, які, здається, можна пояснити накопиченням ліпідних метаболітів у мембранному бішарі [McKersie and Thompson, 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 508: 197-212; Chia, et al., 1981, *Plant Physiol.*, 67:415-420]. Зростає кількість свідчень на користь того, що метаболізм ліпідів у старіючій тканині значною мірою відбувається шляхом старіння-специфічних змін генної експресії [Buchanan-Walston, V., *J. Exp. Bot.*, 1997, 307:181-199].

Початок старіння може бути індукований різними факторами як внутрішніми, так і зовнішніми. Наприклад, етилен у багатьох рослин відіграє певну роль у різноманітних рослинних процесах, таких як проростання насіння, розвиток ростків, досягання плодів та старіння квіток. Продукування етилену у рослин може бути також асоційоване з травмами, індукованими механічними ранами, хімікатами, стресом (таким як спричинені змінами температури та кількості води) та хворобами. Вважається, що етилен бере участь у регуляції старіння листя у багатьох рослин, але дані, одержані для трансгенних рослин та мутантів зі зміненою етиленовою реакцією вказують на те, що хоч етилен і має вплив на старіння, він не є суттєвим регулятором цього процесу. У багатьох рослин етилен, здається, не відіграє ніякої ролі у досягненні плодів чи старінні. Наприклад, під час досягання плодів неклімактеричних рослин, таких як суніця, під час старіння деяких квіток, таких як гемерокаліс та під час старіння листя деяких рослин, таких як *Arabidopsis*, і зокрема, у однодольних рослин немає потреби у етиленовій сигналізації [Smart, C.M., 1994, *New Phytology*, 126:419-448; Valpuesta et al., 1995, *Plant Mol. Biol.*, 28:575-582].

Зовнішні фактори, що індукують передчасну ініціацію старіння, включають в себе середовищні стреси, такі як температура, посуха, погане освітлення чи надходження живильних речовин, а також ураження патогенами. Як і у випадку природного (вік-спорідненого) старіння, старіння,

індуковане середовищним стресом, характеризується втратою цілісності клітинної мембрани. Зокрема, дія середовищного стресу індукує витік електrolіту, спричинений пошкодженням мембрани [Sharon et al., 1994, *Plant Physiol.*, 105:305-308; Wright and Simon, 1973, *J. Exp. Botany*, 24:400-411; Wright, M., 1974, *Planta*, 120:63-69; та Ezeetal., 1986, *Physiologia Plantarum*, 68:323-328], зниження рівнів мембранних фосфоліпідів [Wright, M., 1974, *Planta*, 120:63-69] та фазові переходи ліпідів [Sharon et al., 1994, *Plant Physiol.*, 105:305-308], причому всі ці ефекти можуть бути віднесені на рахунок дії ліпази. Рослинні тканини, піддані дії середовищного стресу, також продукують етилен, загальновідомий як стресовий етилен [Buchanan-Wollaston, V., 1997, *J. Exp. Botany*, 48:181-199; Wright, M., 1974, *Planta*, 120:63-69]. Як відзначалося вище, відомо, що етилен спричинює старіння у деяких рослин. Погіршення стану мембрани, яке приводить до витікання, є також первинною ознакою старіння насіння, і існують свідчення того, що це також пов'язане з деетерифікацією жирних кислот з мембранних фосфоліпідів [McKersie, B.D., Senarata, T., Walker, M.A., Kendall, E.J. and Hetherington, P.R. In: *Senescence and Aging in Plants*, Ed. L.D. Nooden and A.C. Leopold, Academic Press, 1988, pp.441-464].

Сьогодні не існує широко застосовного способу контролю початку старіння, спричиненого внутрішніми чи зовнішніми, наприклад середовищним стресом, факторами. Нинішня технологія контролю за старінням та подовженням терміну зберігання свіжої швидкопсувної рослинної продукції, такої як фрукти, квіти та овочі, покладається переважно на зниження біосинтезу етилену. Наприклад, у [патенті США №5824875] розкрито трансгенні рослини герані, які мають подовжений термін зберігання завдяки зниженню рівнів етилену внаслідок експресії одного з трьох генів 1-аміноциклопропан-1-карбоксилатсинтази (ACC) в антисмисловій орієнтації. Отже, цю технологію застосовують лише для обмеженої групи рослин, які є етиленчутливими.

Термін зберігання деяких плодів також подовжується шляхом зниження біосинтезу етилену, яке приводить до уповільнення досягання. Оскільки старіння цих плодів індукується після досягання, ефект зниження біосинтезу етилену на термін зберігання є непрямим. Іншим підходом; що використовується для уповільнення досягання плодів, є зміна клітинних рівнів полігалактуронази, ферменту пом'якшення клітинної стінки, яка синтезується на ранніх стадіях досягання. Цей підхід є аналогічним до контролю біосинтезу етилену в тому, що він також лише опосередковано впливає на старіння і застосовується до незначної групи рослин.

Отже, існує потреба у способі, контролі за старінням рослин, застосовному до різноманітних рослин. Тому було б цікаво розробити технології модуляції старіння, застосовні до усіх типів рослин, незалежно від чутливості до етилену.

Цей винахід оснований на відкритті та клонуванні повного клону кДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу гвоздики та повного клону кДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу *Arabidopsis thaliana*. Нуклеотидні послідовності та відповідні

амінокислотні послідовності генів старіння-індукованої ліпази розкриті в цьому описі. Нуклеотидна послідовність гена старіння-індукованої ліпази гвоздики успішно використовувалася як гетерологічний зонд для детектування відповідних генів чи транскриптів РНК у кількох рослин з аналогічними механізмами регуляції.

У винаході пропонується спосіб генетичної модифікації рослин з метою контролю за початком як вік-спорідненого старіння, так і старіння, індукованого середовищним стресом. Нуклеотидні послідовності старіння-індукованої ліпази за винаходом, їхні фрагменти чи комбінації таких фрагментів вводять у рослинну клітину у зворотній орієнтації для інгібування експресії ендogenous гена старіння-індукованої ліпази, тим самим знижуючи рівень ендogenous старіння-індукованої ліпази та змінюючи процес старіння у трансформованій рослині.

Використовуючи способи за винаходом, одержують трансгенні рослини, за ростом та розвитком яких проводять спостереження. Рослини чи окремі частини рослин (наприклад, живці, квітки, овочі, плоди, насіння чи листя), що виявляють збільшену тривалість життя чи термін зберігання за показниками росту рослини, цвітіння, зменшене псування плодів, знижене старіння насіння та/або зменшене пожовтіння листів внаслідок зниження рівня старіння-індукованої ліпази, відбирають як бажані продукти, що мають поліпшені властивості, включаючи знижене пожовтіння листів, знижене опадання пелюстків, зменшене псування плодів під час транспортування та зберігання. Ці кращі рослини розмножують. Аналогічно, рослини, які виявляють підвищену стійкість до середовищного стресу, наприклад, знижену сприйнятливості до низьких температур (заморозків), посухи, інфекції і т.п., відбирають як кращі продукти.

В одному з аспектів, даний винахід стосується ізолюваної молекули ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, у якій молекула ДНК гібридизована із SEQ ID NO:1, або функціонального похідного ізолюваної молекули ДНК, що гібридується із SEQ ID NO:1. В одному з варіантів втілення, ізолювана молекула ДНК має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1, тобто 100% комплементарність (ідентичність послідовності) до SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення цього аспекту винаходу, ізолювана молекула ДНК містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:4..

Винахід також стосується ізолюваної молекули ДНК, яка кодує старіння-індуковану ліпазу, де молекула ДНК гібридується з SEQ ID NO:18, або функціонального похідного ізолюваної молекули ДНК, яка гібридується з SEQ ID NO:18. В одному варіанті втілення цього аспекту винаходу, ізолювана молекула ДНК має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:18, тобто 100% комплементарність (ідентичність послідовності) з SEQ ID NO:18. В іншому варіанті втілення цього аспекту винаходу, ізолювана молекула ДНК містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:19.

В іншому варіанті втілення винаходу, пропонується ізолюваний протеїн, що кодується молекулою ДНК, як описано вище, або його функціональне похідне. Кращим протеїном є амінокислотна

послідовність SEQ ID NO:2 або її функціональне похідне.

Також пропонується антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид, що кодує молекулу РНК, комплементарну до принаймні частини РНК-транскрипту описаної вище молекули ДНК, причому молекула РНК гібридується з РНК-транскриптом таким чином, щоб змінювалася експресія ендогенної старіння-індукованої ліпази. Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид може бути повним або переважно може містити від шести до приблизно 100 нуклеотидів.

Антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид є по суті комплементарним до відповідної ділянки однієї нитки молекули ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, гібридується з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи з ними обома, або є по суті комплементарною до відповідної ділянки РНК-послідовності, кодованої молекулою ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу. В одному з варіантів втілення винаходу, антисмисловий олігонуклеотид чи полінуклеотид по суті є комплементарним до відповідної ділянки однієї нитки нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обох, або до РНК-транскрипта, кодованого SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення, антисмисловий олігонуклеотид по суті є комплементарним до відповідного фрагмента з від приблизно 100 до приблизно 200 нуклеотидів 5'-некодуючої ділянки чи 3'-кінцевої ділянки однієї нитки молекули ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК гібридується з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома. В іншому варіанті втілення, антисмисловий оліго- чи полінуклеотид є по суті комплементарним до відповідної ділянки відкритої рамки читування однієї нитки нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:4 чи РНК-транскрипта, кодованого SEQ ID NO:4.

Винахід далі стосується вектора для трансформачії рослинних клітин, який включає в себе

(а) антисмислові нуклеотидні послідовності, по суті комплементарні до (1) відповідної ділянки однієї нитки молекули ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, гібридується з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або (2) відповідної ділянки РНК-послідовності, кодованої молекулою ДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу; і

(б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, що антисмислові нуклеотидні послідовності експресуються у трансформованій рослинній клітині, до якої вони були введені.

Регуляторні послідовності включають промотор, функціональний у трансформованій рослинній клітині, який може бути індукованим чи конститутивним. Необов'язково, регуляторні послідовності включають сигнал поліаденілювання.

Винахід також пропонує рослинну клітину, трансформовану описаним вище вектором, паросток чи дорослу рослину, одержану з такої клітини, або частину такого паростка чи рослини.

Даний спосіб далі стосується способу одержання рослини, що має знижений рівень старіння-індукованої ліпази у порівнянні з немодифікованою рослиною, який включає:

(1) трансформування рослини за допомогою вектора, описаного вище;

(2) надання змоги рослині до росту принаймні до стадії паростка;

(3) оцінку трансформованої рослини чи паростка за показниками зміни старіння-індукованої ліпазної активності та/або зміни процесу старіння та/або зміни старіння, індукованого середовищним стресом та/або етилен-індукованого старіння; і

(4) відбору та вирощування рослини, що має змінену старіння-індуковану ліпазну активність та/або змінений процес старіння та/або змінене старіння, індуковане середовищним стресом, чи етилен-індуковане старіння у порівнянні з нетрансформованою рослиною.

Рослина, одержана, як описано вище, або потомство, гібриди, клони чи частини рослини краще виявляють знижену експресію старіння-індукованої ліпази і уповільнене старіння та/або уповільнене стрес-індуковане старіння чи етилен-індуковане старіння.

Цей винахід далі стосується способу інгібування експресії ендогенної старіння-індукованої ліпази у рослинній клітині, який включає:

(1) введення до геному рослини вектора, який включає

(А) антисмислові нуклеотидні послідовності, комплементарні до (i) відповідної ділянки однієї нитки молекули ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, причому молекула ДНК, що кодує ендогенну старіння-індуковану ліпазу, гібридується з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 чи обома, або (ii) відповідної ділянки РНК-послідовності, кодованої ендогенним геном старіння-індукованої ліпази; і

(Б) регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з антисмисловими нуклеотидними послідовностями таким чином, щоб експресувалися антисмислові нуклеотидні послідовності; і

(2) вирощування вказаної рослини, причому вказані антисмислові нуклеотидні послідовності транскрибуються і транскрипти зв'язуються з вказаною ендогенною РНК, тим самим інгібуючи експресію вказаного гена старіння-індукованої ліпази.

На Фігурі 1 зображено похідну амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:2), кодовану клоном кДНК старіння-індукованої ліпази (SEQ ID NO:1), одержану з бібліотеки кДНК квітки гвоздики. Консенсусні мотиви в амінокислотній послідовності позначені таким чином: підкреслення однією лінією - сайт амідації; підкреслення пунктирною лінією - сайт фосфорилування протеїнкінази С; підкреслення подвійною лінією - сайт N-міристоїлювання; у рамці - сайт фосфорилування цАМФ (сАМФ); у затіненій рамці - сайт фосфорилування казеїнкінази II; у заштрихованій рамці - консенсусна послідовність сімейства ліпаз; і у пунктирній рамці - сайт N-глікозилування.

На Фігурі 2 показано порівняльний аналіз первинної структури похідної повної амінокислотної послідовності старіння-індукованої ліпази пелюстки гвоздики (SEQ ID NO:2) та часткових послідов-

ностей ліпазоподібних протеїнів. Carlip - повна послідовність старіння-індукованої ліпази пелюсток гвоздики (SEQ ID NO:11); arlip1 - часткова послідовність ліпазоподібного протеїну *Arabidopsis thaliana* (Gen Bank Accession No.AL021710) (SEQ ID NO:12); ipolip - часткова послідовність ліпазоподібної полідовності Irotea (Gen Bank Accession No.U55867) (SEQ ID NO:13); alip1 - часткова послідовність ліпазоподібного протеїну *Arabidopsis thaliana* (Gen Bank Accession No.U93215) (SEQ ID NO:14). Ідентичні амінокислоти у трьох чи чотирьох з цих послідовностей узяті в рамку.

На Фігурі 3 зображено результати аналізу способом вестерн-блотингу продукту експресії злитого протеїну, одержаного з кДНК ліпази гвоздики, експресованого у *E.coli*. Як зонди для вестерн-блотування використовували антитіла до протеїну старіння-індукованої ліпази. Ланка 1 - мальтоза-зв'язувальний протеїн, ланка 2 - злитий протеїн, що складається з ліпази гвоздики, зливої з використанням сайту протеолітичного розщеплення (Фактор Ха) з кДНК мальтоза-зв'язувального протеїну, ланка 3 - злитий протеїн, частково розщеплений за допомогою Фактора Ха на вільний протеїн ліпази (50,2кДа) та вільний мальтоза-зв'язувальний протеїн.

На Фігурі 4 зображено результати аналізу способом нозерн-блотингу РНК, ізольованої з пелюстків квіток гвоздики на різних стадіях розвитку. На Фігурі 4А показано забарвлення етидйбромідом гелем з цільною РНК. Кожна ланка містить 10мкг РНК. На Фігурі 4Б зображено авторадіографію нозерн-блоту, одержаного з використанням як зонда <sup>32</sup>P-dCTP-міченої повної кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики.

На Фігурі 5 продемонстровано *in situ* ліполітичну ацилгідролазу, тобто ліпазну активність протеїнового продукту, одержаного надекспресією кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики у *E.coli*. mal - клітини *E.coli*, які містять лише мальтоза-зв'язувальний протеїн у базальному сольовому середовищі; mLip - клітини *E.coli*, що містять злитий протеїн, який складається зі старіння-індукованої ліпази гвоздики, зливої з мальтоза-зв'язувальним протеїном, у базальному сольовому середовищі; 40 mal/40 mLip - клітини *E.coli*, що містять тільки мальтоза-зв'язувальний протеїн [mal] або продукти злиття мальтоза-зв'язувального протеїну [mLip] у базальному сольовому середовищі з домішкою твін-40; 60 mal/60 mLip - клітини *E.coli*, що містять тільки мальтоза-зв'язувальний протеїн [mal] або продукт злиття ліпазо-мальтоза-зв'язувального протеїну [mLip] у базальному сольовому розчині з домішкою твін-60.

На Фігурі 6А проілюстровано карту рестрикційного ферменту відкритої рамки зчитування старіння-індукованої ліпази гвоздики. Цифри позначають нуклеотиди у відкритій рамці зчитування.

На Фігурі 6Б зображено результати аналізу способом саузерн-блотингу геномної ДНК гвоздики, гідролізованої різними рестрикційними ферментами, з використанням як зонда кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики.

На Фігурі 7 зображено нуклеотидну послідовність клону кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики (SEQ ID NO:1). Підкреслення суцільною лінією - некодуюча послідовність старіння-індукованої ліпазної кДНК; не підкреслена послідовність позначає відкриту рамку зчитування.

На Фігурі 8 зображено амінокислотну послідовність кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики (SEQ ID NO:2).

На Фігурі 9А представлено результати аналізу способом нозерн-блотингу, що показують експресію ліпази гвоздики у пелюстках стадії II, які експонували 0,05млн<sup>-1</sup> етилену протягом 15 годин. На Фігурі 9А зображено забарвлений етидйбромідом гель, у якому кожна ланка містить постійну кількість РНК гвоздики (пелюстки: ланки 1 та 2; листя: ланки 3 та 4; + - після обробки етиленом; - - необроблені). На Фігурі 9Б представлено авторадіограму нозерн-блоту гелю за Фігурою 9А, з використанням як зонда міченої повної кДНК старіння-індукованої ліпази пелюстків гвоздики.

На Фігурі 10 представлено часткову нуклеотидну послідовність геномної старіння-індукованої ліпази листів томата (SEQ ID NO:6) та відповідної розшифрованої амінокислотної послідовності (SEQ ID NO:17). Консервативний консенсусний мотив ліпази затінений; усі послідовності праймерів, використаних для одержання геномного фрагмента, підкреслені.

На Фігурі 11 представлено стовпчикову діаграму, яка показує вплив заморозків на здатність просочування мембран. Рослини томата охолоджували до 8°C протягом 48 годин, а потім знов зігрівали до кімнатної температури. Витік дифузату (мкСм) з листяних дисків вимірювали для контрольних рослин, які не піддавали охолодженню, та для рослин, які піддавали охолодженню, через 6 та 24 години.

На Фігурі 12 зображено результати аналізу способом нозерн-блотингу РНК листя томата, ізольованої з рослин, які піддавали охолодженню при 8°C протягом 48 годин і знов зігрівали до температури навколишнього середовища протягом 24 годин. На Фігурі 12А зображено гель цільної РНК листя. На Фігурі 12Б представлено авторадіографію нозерн-блоту з використанням як зонда <sup>32</sup>P-dCTP-міченої повної кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики.

На Фігурі 13 представлено часткову нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO:15) та відповідну розшифровану амінокислотну послідовність *Arabidopsis* EST (GenBank Ace. No: N38227) (SEQ ID NO:16), яка є на 55,5% ідентичною на ділянці з 64 амінокислот зі старіння-індукованою ліпазою гвоздики. Консервативний консенсусний мотив ліпази затінений.

На Фігурі 14 зображено нуклеотидну (зверху) (SEQ ID NO:18) та розшифровану амінокислотну (знизу) послідовності (SEQ ID NO:19) повного гена старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*.

На Фігурі 15 представлено нозерн-блот цільної РНК, ізольованої з листя рослин *Arabidopsis* на різних стадіях (ланка 1 - рослини у віці двох тижнів; ланка 2 - рослини у віці трьох тижнів; ланка 3 - рослини у віці чотирьох тижнів; ланка 4 - рослини у віці п'яти тижнів; ланка 5 - рослини у віці шести тижнів), з використанням як зонда <sup>32</sup>P-сіСТР-міченої повної старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*. Зверху показано авторадіографію

(15A), а унизу - гель, забарвлений етидйбромідом (15B).

На Фігурі 16 представлено нозерн-блот цільної РНК, ізольованої з листя рослин *Arabidopsis* у віці трьох тижнів, оброблених 50мМ етефоном (джерело етилену), з використанням як зонда  $^{32}\text{P}$ -dCTP-міченої повної старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*. Зверху - авторадіографія (16A), а унизу - гель, забарвлений етидйбромідом (16B).

На Фігурі 17 представлено фотографію рослин дикого типу *Arabidopsis* у віці 4,6 тижня (ліворуч) та трансгенних рослин (праворуч), що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* у антисмисловій орієнтації, яка показує збільшений розмір листів трансгенних рослин.

На Фігурі 18 представлено фотографію рослин дикого типу *Arabidopsis* у віці 6,3 тижня (ліворуч) та трансгенних рослин (праворуч), що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* у антисмисловій орієнтації, яка показує збільшений розмір листів та уповільнене старіння листів трансгенних рослин.

На Фігурі 19 представлено фотографію рослин дикого типу *Arabidopsis* у віці 7 тижнів (ліворуч) та трансгенних рослин (праворуч), що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* у антисмисловій орієнтації, яка показує збільшений розмір листів трансгенних рослин.

На Фігурі 20 представлено діаграму, яка показує збільшення врожаю насіння у трьох Т<sub>1</sub>-трансгенних ліній рослин *Arabidopsis*, що експресують ген старіння-індукованої ліпази у антисмисловій орієнтації. Врожай насіння виражений в об'ємі насіння. Для рослин дикого типу вказана стандартна похибка (SE) для  $n=30$ .

На Фігурі 21 зображено вестерн-блот цільного протеїну, ізольованого з листя рослин *Arabidopsis* дикого типу у віці чотирьох тижнів, та відповідних трансгенних рослин, що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази у антисмисловій орієнтації. (Ланки 1 та 2 містять 9мкг протеїну, а ланки 3 та 4 містять 18мкг протеїну). Як зонд для блоту використовували антитіло, одержане проти протеїну старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*. Експресія старіння-індукованої ліпази знижувалася у всіх трансгенних рослин.

Запропоновані способи та композиції для зміни експресії гена (генів) старіння-індукованої ліпази у рослинних клітинах. Зміна експресії гена (генів) старіння-індукованої ліпази у рослинах приводить до затримки початку старіння та підвищення стійкості до середовищного стресу, тим самим збільшуючи термін зберігання рослини та/або період росту.

Повна послідовність кДНК, що кодує ген ліпази гвоздики, який виявляє старіння-індуковану експресію, був ізольований з бібліотеки кДНК, виготовленої з РНК старіючих пелюстків квіток гвоздики (*Dianthus caryophyllus*). Полінуклеотидні зонди, які відповідають обраним ділянкам ізольованої, послідовності кДНК ліпази квітки гвоздики, а також повна кДНК ліпази гвоздики використовувалися для визначення присутності мРНК, що кодує ген ліпази у старіючому листі гвоздики, досягаючих плодах томата та старіючому листі овочевої квасолі, а також листі томата, підданому середовищ-

ному стресу (заморозкам). Праймери, сконструйовані з кДНК ліпази гвоздики, були використані для одержання продукту полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з використанням як матриці геномної ДНК листя томата. Продукт PCR містить часткову відкриту рамку зчитування, яка кодує часткову послідовність протеїну, включаючи консервативний консенсусний мотив ліпази ITFTGHSGLGA (SEQ ID NO:3). Нуклеотидна послідовність томата має ступінь ідентичності послідовності 53,4% з полідовністю старіння-індукованої ліпази гвоздики і 43,5% з послідовністю ліпази *Arabidopsis*. Послідовність ліпази *Arabidopsis* має ступінь ідентичності 44,3% з нуклеотидною послідовністю гвоздики.

Ген старіння-індукованої ліпази гвоздики за даним винаходом був ізольований шляхом скринінгу бібліотеки експресії кДНК, виготовленої зі старіючих пелюстків гвоздики з використанням анти-тіл, одержаних проти цитозольних ліпідно-протеїнових частинок, які є джерелом ліпази гвоздики. Був одержаний та секвенований позитивний повний клон кДНК, який відповідає гену старіння-індукованої ліпази гвоздики. Нуклеотидна послідовність клону кДНК старіння-індукованої ліпази наведена у SEQ ID NO:1. Клон кДНК кодує поліпептид з 447 амінокислот (SEQ ID NO:2), який має розрахункову молекулярну масу 50,2кДа. Експресія клону кДНК у *E.coli* дала протеїн з очікуваною молекулярною вагою, який виявляє ацилгідролазну активність, тобто експресований протеїн гідролізує *p*-нітрофенілпальмітат, фосфоліпід та триацилгліцерин. На основі характеру експресії ферменту у квітках гвоздики, що розвиваються, та активності протеїну можна зробити висновок про те, що він бере участь у процесах старіння.

Ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* за даним винаходом був також ізольований шляхом PCR з використанням бібліотеки кДНК старіючого листя *Arabidopsis* як матриці для проведення реакції. Нуклеотид та розшифрована амінокислотна послідовність гена старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* зображені на Фігурі 14 (SEQ ID NO:18). Судячи з характеру експресії гена ліпази у рослинах, що розвиваються, він бере участь у старінні.

Нозерн-блотинг загальної РНК пелюстків гвоздики з використанням як зонда повної кДНК гвоздики показує, що експресія гена старіння-індукованої ліпази у значному ступені індукується безпосередньо перед початком природного старіння (Фігура 4). Аналіз способом нозерн-блотингу також демонструє, що ген старіння-індукованої ліпази індукується умовами середовищного стресу, наприклад, заморозками (Фігура 12) та етиленом (Фігури 4 та 9), що, як відомо, продукується у відповідь на середовищний стрес. Аналізи способом нозерн-блотингу показують, що присутність мРНК старіння-індукованої ліпази гвоздики є значно вищою у старіючих (стадія розвитку IV) пелюстків гвоздики, ніж у молодих на стадіях I, II та III. Крім того, етилен-стимульовані квітки на стадії II також виявляють вищу експресію гена старіння-індукованої ліпази. Аналогічно, рослини, які були експоновані температурою заморозку, а потім повернені до температури навколишнього середовища, також виявляють індуковану експресію гена старіння-індукованої ліпази, яка співпадає з розви-



тком симптомів ушкоджень від заморозків (напр., здатність просочування) (Фігури 11 та 12).

Експресія гена старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* регулюється аналогічно. Аналіз способом нозерн-блотингу загальної РНК з листя рослин *Arabidopsis* на різних стадіях розвитку показують, що підвищувальна регуляція гена ліпази співпадає з початком старіння листів (Фігура 15). Також, аналогічно гену старіння-індукованої ліпази гвоздики, ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* зазнає підвищувальної регуляції при обробці етиленом, який є рослинним гормоном, що індукує старіння листів (Фігура 16).

Загальний характер експресії гена у різних рослинах, наприклад, гвоздиці, овочевій квасолі, томатах, *Arabidopsis* та різних рослинних тканинах, наприклад, листах, плодах та квітках, демонструє, що гени ліпази за винаходом беруть участь у ініціації старіння у цих рослин та у рослинних тканинах. Отже, очікується, що шляхом істотного пригнічення чи зміни експресії генів старіння-індукованої ліпази у рослинних тканинах можна затримати старіння, погіршення властивостей та псування, збільшуючи термін зберігання швидкопсuvних плодів, квіток та овочів. Це може бути досягнуто шляхом створення трансгенних рослин, у яких ліпазна кДНК чи її олігонуклеотидний фрагмент експресується у антисмисловій конфігурації у плодах, квітках, овочах, сільськогосподарських культурах та лісових видах, переважно з використанням конститутивного промотору, такого як промотор CaMV 35S, або з використанням тканина-специфічного чи старіння-індукованого промотору.

Ген старіння-індукованої ліпази гвоздики є одноклітинним геном. Був проведений аналіз способом саузерн-блотингу геномної ДНК гвоздики, розщепленої різними рестрикційними ферментами, які не розпізнають послідовності у відкритій рамці читування кДНК старіння-індукованої ліпази. Гідролізовану рестрикційними ферментами геномну ДНК досліджували з використанням як зонда <sup>32</sup>P-dCTP-міченої повної кДНК (SEQ ID NO:1). За дуже суворих умов гібридизації лише один рестрикційний фрагмент гібридується з клоном кДНК (68°C як для гібридизації, так і для промивання; буфер для промивання: 0,2% x SSC (хлориду-цитрату натрію), 0,1% SDS (додецилсульфату натрію)). Таким чином, ген старіння-індукованої ліпази гвоздики є одноклітинним геном (Фігура 6). Той факт, що цей ген не є членом мультигенного сімейства у гвоздик, є вагомим свідченням на користь того, що він є одноклітинним геном у інших рослин.

Знання повної нуклеотидної послідовності гена старіння-індукованої ліпази гвоздики чи гена старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* є достатнім для ізоляції гена (генів) старіння-індукованої ліпази з різних інших видів рослин. Дійсно, як продемонстровано в цьому описі, олігонуклеотидні праймери, основані на послідовності кДНК гвоздики, були успішно використані для одержання фрагментів гена старіння-індукованої ліпази листя томатів способом полімеразної ланцюгової реакції з використанням як матриці геномної ДНК листів томата.

Клонований ген(и) старіння-індукованої ліпази чи його (їхні) фрагменти, самі чи у комбінаціях, при введенні у зворотній (антисмисловій) орієнтації під контролем конститутивного промотору, такого як промотор 35S вірусу бородавчастої мозаїки фікусу, промотор CaMV 35S чи промотор MAS вірусу мозаїки цвітної капусти, може бути використаний для генетичної модифікації рослин та зміни процесу старіння у модифікованих рослин. Обрані антисмислові послідовності від інших рослин, які мають достатній ступінь ідентичності послідовностей з геном старіння-індукованої ліпази гвоздики, можуть бути використані для досягнення аналогічної генетичної модифікації. Одним з результатів генетичної модифікації є зниження кількості ендегенної трансльованої старіння-індукованої ліпаза-кодуючої мРНК. Отже, знижується кількість старіння-індукованої ліпази, що продукується у рослинних клітинах, тим самим знижуючи ступінь ушкодження клітинної мембрани та здатності просочування клітин, наприклад, зменшуючи старіння та псування листів, плодів та/або квіток внаслідок старіння чи середовищного стресу.

Наприклад, рослини *Arabidopsis*, трансформовані векторами, що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* у антисмисловій орієнтації під контролем подвійного промотору 35S, мають більший розмір листів та загалом виявляють більший ріст рослин у порівнянні з рослинами дикого типу, як показано на Фігурах 17 та 18. Ці рослини також демонструють затримку старіння листів, як показано на Фігурі 19.

Ефект зниженої експресії гена старіння-індукованої ліпази, спричиненої експресією повного гена ліпази в антисмисловій орієнтації у трансгенних рослин *Arabidopsis* виявляється також у збільшенні врожаю насіння трансформованих рослин. Лінії рослин *Arabidopsis*, що експресують повний ген старіння-індукованої ліпази, продукують насіння приблизно у два-три рази більше, ніж рослини дикого типу (Фігура 20).

Те що ефекти, які спостерігаються для трансгенних рослин у біомасі, старінні листів та врожаї насіння, спричинені зниженням рівня старіння-індукованої ліпази в цих рослинах, показано на Фігурі 21. Трансгенні рослини за винаходом виявляють істотно знижену експресію старіння-індукованої ліпази у порівнянні з рослинами дикого типу.

Таким чином, способи та послідовності за даним винаходом можуть бути використані для затримки псування рослин, включаючи псування листів чи плодів, а також збільшення біомаси рослин та врожай насіння, і загалом змінюють процес старіння у рослин.

Ізольовані нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути використані для ізоляції по суті комплементарної нуклеотидної послідовності старіння-індукованої ліпази від інших рослин чи організмів. Ці послідовності можуть, у свою чергу, бути використані для трансформування рослин і, тим самим, зміни процесу старіння трансформованих рослин у такий саме спосіб, як показано для використання описаних тут ізольованих нуклеотидних послідовностей.

Генетичні модифікації, що спостерігаються при трансформуванні рослин старіння-індукованою ліпазою, її функціональними фрагментами чи їхніми комбінаціями, можуть забезпечити постійну зміну рівнів старіння-індукованої ліпази у рослині, і можуть розмножуватися у рослинному потомстві шляхом самозапилення чи за іншими схемами розмноження. Генетично змінена рослина використовується для продукування нової лінії рослин, у якій зміна стабільно передається від покоління до покоління. У даному винаході уперше пропонується відповідні ДНК-послідовності, які можуть бути використані для досягнення стабільної генетичної модифікації процесу старіння у широкого спектра різних рослин.

Для ідентифікації та ізоляції гена старіння-індукованої ліпази здійснювали приготування плазмідної ДНК, гідроліз рестрикційним ферментом, електрофорез ДНК на агарозному гелі, електрофорез протеїну на поліакриламідному гелі, саузерн-блотинг, нозерн-блотинг, лігування ДНК та бактеріальні трансформації з використанням звичайних способів, добре відомих фахівцям в цій області техніки. [Див., наприклад, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]. Методи гібридизації нуклеїнових кислот розкриті у Sambrook (вище).

У тому значенні, що використовується тут, термін "рослина" стосується рослини в цілому, частини рослини чи групи рослинних клітин. Тип рослини, який може бути використаний у способі за винаходом, не обмежений і включає, наприклад, етилен-чутливі та етилен-нечутливі рослини; плодові рослини, такі як абрикоси, яблуни, апельсини, банани, грейпфрути, груші, томати, полуниця, авокадо і т.д.; овочі, такі як морква, горошок, салат, капуста, турнепс, картопля, броколі, спаржа і т.д.; квіти, такі як гвоздики, рози, мімози і т.д.; і загалом, будь-яку рослину, що може сприймати та експресувати молекули ДНК за даним винаходом. Він може включати рослини будь-якого рівня плоідності, включаючи гаплоїдні, диплоїдні, тетраплоїдні та поліплоїдні.

Трансгенна рослина визначається тут як рослина, генетично модифікована у певний спосіб, включаючи, без обмеження, рослину, до геному якої було введено гетерологічну чи гомологічну ДНК чи модифіковану ДНК старіння-індукованої ліпази чи певну частину ДНК гетерологічної старіння-індукованої ліпази чи ДНК гомологічної старіння-індукованої ліпази. Змінений генетичний матеріал може кодувати протеїн, включати регуляторну чи контрольну послідовність, або може бути антисмисловою послідовністю чи включати антисмислову послідовність, або кодувати антисмислову РНК, що є антисмисловою до ДНК чи мРНК-послідовності ендегенної старіння-індукованої ліпази рослини чи її частини. "Трансген" чи "трансгенна послідовність" визначається як чужорідний ген чи часткова послідовність, які було введено до трансгенної рослини.

Термін "гібридизація" в тому значенні, що прийняте тут, загалом використовується для позначення гібридизації нуклеїнових кислот за умов відповідної суворості, як це має бути зрозуміло

фахівцям, залежно від природи послідовностей зонда та послідовностей мішеней. Умови гібридизації та промивання добре відомі фахівцям, а регулювання умов залежно від бажаної суворості легко здійснюється шляхом варіювання часу інкубування, температури та/або іонної сили розчину. [Див., наприклад, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]. Вибір умов визначається довжиною послідовностей, що гібридизуються, зокрема довжиною послідовності зонда, відносним G-C вмістом нуклеїнових кислот та кількістю припустимих порушень комплементарності. Умови з низькою суворістю є кращими, якщо бажаною є часткова гібридизація ниток, що мають менші ступені комплементарності. Якщо бажана повна чи майже повна комплементарність, кращими є умови високої суворості. Для типових умов високої суворості, розчин для гібридизації містить 6× SSC, 0,01M EDTA, 1× розчин Денхарта та 0,5% DCH. Гібридизацію проводять при приблизно 68°C протягом приблизно 3-4 годин для фрагментів клонованої ДНК та від приблизно 12 до приблизно 16 годин для цільної еукаріотичної ДНК. При меншій суворості, температуру гібридизації знижують до приблизно 12°C нижче від температури плавлення ( $T_m$ ) дуплекса. Відомо, що  $T_m$  є функцією вмісту G-C і довжини дуплекса, а також іонної сили розчину.

У тому значенні, що використовується тут, термін "суттєва ідентичність послідовності" чи "суттєва гомологія" використовується для позначення того, що нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність виявляє суттєву структурну чи функціональну еквівалентність з іншою нуклеотидною чи амінокислотною послідовністю. Будь-яка структурна чи функціональна різниця між послідовностями, що мають суттєву ідентичність послідовностей чи суттєву гомологію, має бути мінімальною, тобто вона не повинна впливати на здатність послідовності функціонувати, як це потрібно у зазначеному застосуванні. Розбіжності можуть бути спричинені, наприклад, варіаціями використання кодонів, властивими різним видам. Структурні розбіжності вважаються мінімальними, якщо для двох чи більше різних послідовностей спостерігається значний ступінь перекривання чи подібності послідовностей, або якщо послідовності виявляють аналогічні фізичні характеристики, навіть якщо ці послідовності відрізняються довжиною чи структурою. Такі характеристики включають, наприклад, здатність гібридизуватися за певних умов або, у випадку протеїнів, імунологічну кросреактивність, аналогічну ферментативну активність тощо.

Крім того, дві нуклеотидні послідовності є "по суті комплементарними", якщо ступінь подібності цих послідовностей становить щонайменше приблизно 40 процентів, краще, щонайменше приблизно 60 процентів, і найкраще, приблизно 90 процентів. Дві амінокислотні послідовності є по суті гомологічними, якщо вони мають ступінь подібності між активними ділянками поліпептидів щонайменше 40%, краще, 70%.

У тому значенні, що використовується тут, фраза "гібридизується з відповідною частиною" молекули ДНК чи РНК означає, що молекула, яка

гібридується, наприклад, олігонуклеотид, полі-нуклеотид чи будь-яка нуклеотидна послідовність (у смисловій чи антисмисловій орієнтації) розпізнає та гібридується з послідовністю в іншій молекулі нуклеїнової кислоти, що має приблизно такий саме розмір та достатній ступінь подібності послідовності для забезпечення можливості гібридизації за відповідних умов. Наприклад, антисмислова молекула довжиною 100 нуклеотидів з 3'-кодуючої чи некодуючої ділянки ліпази гвоздики розпізнає та гібридується з ділянкою довжиною близько 100 нуклеотидів нуклеотидної послідовності з 3'-кодуючої чи некодуючої ділянки, відповідно, гена старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis* або будь-якого іншого рослинного гена старіння-індукованої ліпази, якщо дві послідовності мають ступінь подібності приблизно 70% чи більше. Слід розуміти, що розмір "відповідної частини" має дозволити деякі порушення комплементарності при гібридизації, так що "відповідна частина" може бути меншою чи більшою за молекулу, яка гібридується з нею, наприклад, більшою чи меншою на 20-30%, краще, більшою чи меншою не більш, ніж приблизно на 12-15%.

Термін "функціональне похідне" нуклеїнової кислоти (або полі- чи олігонуклеотиду) використовується в цьому описі для позначення фрагмента, варіанта, гомолога чи аналога гена чи нуклеотидної послідовності, що кодує старіння-індуковану ліпазу. Функціональне похідне може зберігати принаймні частину функції ДНК, яка кодує старіння-індуковану ліпазу, що дозволяє її використання відповідно до винаходу. Така функція може включати здатність гібридуватися з нативною старіння-індукованою ліпазою гвоздики чи суттєво гомологічною ДНК від іншої рослини, що кодує старіння-індуковану ліпазу чи з її мРНК-транскриптом, або, в антисмисловій орієнтації, інгібувати транскрипцію та/або трансляцію рослинної мРНК старіння-індукованої ліпази і тощо.

"Фрагмент" гена чи ДНК-послідовності стосується будь-якої частини молекули, наприклад, коротшого полінуклеотиду чи олігонуклеотиду. "Варіант" стосується молекули, по суті аналогічної цілому гену чи його фрагменту, такого як варіант нуклеотидного заміщення, що має один чи кілька заміщених нуклеотидів, але який зберігає здатність гібридуватися з конкретним геном або кодувати мРНК-транскрипт, що гібридується з нативною ДНК. "Гомолог" стосується послідовності фрагмента чи варіанта від різних рослинних родів чи видів. "Аналог" стосується неприродної молекули, по суті аналогічної за структурою чи функцією до цілої молекули, її варіанта чи фрагмента.

"Змінена експресія" чи "модифікована експресія" гена, наприклад, гена старіння-індукованої ліпази, позначає будь-який процес чи результат, у якому нормальна експресія гена, наприклад, та експресія, що відбувається у немодифікованій гвоздиці чи іншій рослині, є зміненою у певний спосіб. У цілях даного опису, зміною експресії гена вважається повне чи часткове зниження експресії гена старіння-індукованої ліпази, але вона може також включати зміну часового графіка експресії або інший стан, у якому експресія гена старіння-індукованої ліпази відрізняється від такої, що най-

вірогідніше відбувається за природних умов у немодифікованій рослині чи сорті рослини. Кращою зміною є така, що приводить до зниження продукування рослиною старіння-індукованої ліпази у порівнянні з продукуванням у немодифікованій рослині.

При одержанні генетично зміненої рослини відповідно до даного винаходу, краще обирають індивідуальні паростки чи рослини за бажаною ознакою, звичайно, зниженою експресією чи продукуванням старіння-індукованої ліпази. Експресія старіння-індукованої ліпази може бути визначена кількісно, наприклад, звичайним способом імуноаналізу з використанням специфічного антитіла, як описано в цьому документі. Може бути також виміряна ферментативна активність старіння-індукованої ліпази за допомогою біохімічних способів, описаних в цьому документі.

Для забезпечення можливості експресії нового вставленого гена чи послідовності ДНК, що приводить до продукування протеїну, який вони кодують, або, у випадку антисмислової ДНК, що має бути транскрибована, до одержання антисмислової молекули РНК, належні регуляторні елементи мають бути присутніми у належних положеннях та орієнтації по відношенню до гена чи ДНК-послідовності. Регуляторні ділянки можуть включати промотор, 5'-нетрансльовану лідерну послідовність та 3'-послідовність поліаденілювання, а також енхансери та інші регуляторні послідовності.

Промоторні регуляторні елементи, придатні для використання з геном старіння-індукованої ліпази для одержання смислових чи антисмислових транскриптів гена, включають загалом будь-який рослинний промотор, а конкретніше, конститутивний промотор, такий як промотор 35S вірусу бородавчастої мозаїки фікусу, подвійний промотор 35S, промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, промотор CaMV 35S чи промотор MAS, або тканина-специфічний чи старіння-індукований промотор, такий як промотор GST1 пелюстків гвоздики чи промотор SAG12 *Arabidopsis* [див., наприклад, J.C.Palauqui et al., *Plant Physiol.*, 112:1447-1456(1996); Morton et al., *Molecular breeding*, 1:123-132 (1995); Fobert et al., *Plant Journal*, 6:567-577 (1994); та Gan et al., *Plant Physiol.*, 113:313 (1997), які включені до цього опису як посилання]. Краще, промотор, що використовується в даному винаході, є конститутивним промотором.

Рівні експресії промотору, який є придатним для використання за даним винаходом, можуть бути перевірені з використанням звичайних систем експресії, наприклад, шляхом вимірювання рівнів продукту репортерного гена, наприклад, протеїну чи мРНК у екстрактах листя, квіток, плодів чи інших тканин трансгенної рослини, до якої був введений промотор/репортер.

Даний винахід пропонує антисмислові олігонуклеотиди та полінуклеотиди, комплементарні до гена, що кодує старіння-індуковану ліпазу гвоздики, комплементарні до гена, що кодує старіння-індуковану ліпазу *Arabidopsis*, або комплементарні до гена чи генного фрагмента від іншої рослини, який гібридується з геном старіння-індукованої ліпази гвоздики чи *Arabidopsis* за умов від низької до високої суворості. Такі антисмислові олігонук-

леотиди повинні мати у довжину щонайменше приблизно шість нуклеотидів для забезпечення мінімальної специфічності гібридизації і можуть бути комплементарними до однієї нитки ДНК чи мРНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу чи її частину, або до фланкуючих послідовностей геномної ДНК, які беруть участь у регулюванні експресії гена старіння-індукованої ліпази. Антисмисловий олігонуклеотид може складатися з приблизно до 100 нуклеотидів і за довжиною може сягати довжини повної кодуючої послідовності, до якої він є антисмисловим, чи перевищувати її. Антисмислові олігонуклеотиди можуть бути ДНК чи РНК або хімерними сумішами ДНК та РНК або їхніх похідних чи модифікованих варіантів, одониткових чи двониткових.

Дія антисмислових олігонуклеотидів може спричинити зміну, насамперед інгібування, експресії гена старіння-індукованої ліпази у клітинах. Загальне обговорення антисмислових послідовностей див. у: [Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2<sup>nd</sup> ed., Garland Publishing, Inc., New York, New York (1989, зокрема, сторінки 195-196, що включені сюди як посилання)].

Антисмисловий олігонуклеотид може бути комплементарним до будь-якої частини гена старіння-індукованої ліпази. В одному варіанті втілення, антисмисловий олігонуклеотид може, наприклад, мати довжину від 6 до 100 нуклеотидів і може бути комплементарним до 5'-некодуючої послідовності чи 3'-кінця послідовності старіння-індукованої ліпази. Відомо, що антисмислові олігонуклеотиди, насамперед комплементарні до 5'-некодуючих послідовностей, є ефективними інгібіторами експресії генів, що кодують фактори транскрипції [Branch, MA, *Molec. Cell Biol.*, 13:4284-4290 (1993)].

Кращі антисмислові олігонуклеотиди є по суті комплементарними до відповідної частини мРНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу. Наприклад, очікується, що введення до рослини повного клону кДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, в антисмисловій орієнтації, приведе до успішної зміни експресії гена старіння-індукованої ліпази. Крім того, введення часткових послідовностей, націлених на специфічні ділянки гена старіння-індукованої ліпази, може бути таким саме ефективним.

Мінімальний ступінь гомології, потрібний за даним винаходом, є таким, що достатня для одержання достатньої комплементарності з метою забезпечення розпізнавання специфічної РНК- чи ДНК-мішені та інгібування чи зниження її трансляції чи функції, не впливаючи при цьому на функцію інших молекул РНК чи ДНК та експресію інших генів. Хоч антисмислові олігонуклеотиди за винаходом включають послідовності, комплементарні до щонайменше частини РНК-транскрипта гена старіння-індукованої ліпази, абсолютна комплементарність є кращою, але не обов'язковою. Здатність до гібридизації може залежати від довжини антисмислового олігонуклеотиду та ступеня комплементарності. Загалом, чим довше нуклеїнова кислота, що гібридизується, тим більше порушень комплементарності основ у цільовій послідовності старіння-індукованої ліпази вона може містити,

зберігаючи при цьому здатність утворювати стабільний дуплекс. Фахівець в цій галузі може визначити прийнятний рівень порушення комплементарності за допомогою стандартних методик, наприклад, визначення температури плавлення гібридизованого комплексу.

Антисмислові олігонуклеотиди РНК можуть бути одержані внутрішньоклітинно шляхом транскрипції з екзогенно введених послідовностей нуклеїнових кислот. Антисмислова молекула може бути введена у клітину шляхом трансформації чи трансфекції чи інфікування вектором, таким як плазмід чи вірус, у які було включено ДНК, що кодує антисмислову послідовність старіння-індукованої ліпази, функціонально зв'язану з відповідними регуляторними елементами, включаючи промотор. У клітині екзогенна ДНК-послідовність експресується, продукуючи антисмислову РНК гена старіння-індукованої ліпази.

Переважаючими векторами можуть бути плазмідом, або вони можуть бути вірусними чи іншими векторами, відомими фахівцям, придатними для реплікації та експресії кодованих ними генів у рослинних клітинах чи бактеріальних клітинах. Вектор інтегрується з хромосомами у такий спосіб, щоб він міг транскрибуватися з продукуванням бажаної антисмислової РНК старіння-індукованої ліпази. Такі плазмідні чи вірусні вектори можуть бути сконструйовані способами технології рекомбінантної ДНК, що є стандартними за сучасним рівнем техніки. Наприклад, вектор може бути плазмідним вектором, що містить систему реплікації, функціональну у прокаріотичному хазяїні, та антисмисловий олігонуклеотид чи поліонуклеотид за винаходом. За іншим варіантом, вектор може бути плазмідом, що містить систему реплікації, функціональну у *Agrobacterium*, та антисмисловий олігонуклеотид чи поліонуклеотид за винаходом. Плазмідні, здатні реплікуватися у *Agrobacterium*, добре відомі фахівцям. [Див. Miki et al., *Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Eds. B.R. Glick and J.E. Thompson, CRC Press (1993), pp.67-83].

Ген ліпази гвоздики був клонований в антисмисловій орієнтації до плазмідного вектора у такий спосіб. Плазмідом рCD, сконструйована з остову рUC18, що містить промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), за яким розташований сайт мультиклонування та термінаторна послідовність октапінсинтази, була використана для клонування гена ліпази гвоздики. рCD-ліпазна (антисмислова) плазмідом була сконструйована шляхом субклонування повного гена ліпази гвоздики в антисмисловій орієнтації до сайту EcoR1 та сайту рCd. Аналогічно, плазмідом рCDΔ35S-GST1-ліпази (антисмислова) була сконструйована шляхом спочатку субклонування PCR-ампліфікованого фрагмента (від -703 до +19 п.н.) промотора глутатіон-S трансферази 1 (GST1) гвоздики до сайтів BamH1 та Sal1 вектора рCd. Потім повний ген ліпази гвоздики субклонували в антисмисловій орієнтації до сайтів Hind3 та EcoR1 конструкта. Інша плазмідом - плазмідом рGdΔ35S-GST1-GUS - була сконструйована шляхом спочатку субклонування PCR-ампліфікованого фрагмента (від -703 до +19 п.н.) промотору глутатіон-S трансферази (GST1) гвоз-

дики до сайтів BamH1 та Sal1 вектора pCd. Потім репортерний ген бета-глюкуронідази (GUS) субклонували до сайтів Sal1 та EcoRI конструкта. pCd-35S<sup>-</sup>ліпазна (антисмислова) плазміда була сконструйована шляхом субклонування спочатку подвійного промотора 35S (який містить дві копії промотора CaMV 35S послідовно) до сайтів Sma1 та Hind3 вектора pCd. Потім повний ген ліпази гвоздики субклонували в антисмисловій орієнтації до сайтів Hind3 та EcoRI конструкта.

Олігонуклеотид, який переважно має в довжину від приблизно 6 до приблизно 100 нуклеотидів і є комплементарним до цільової послідовності старіння-індукованої ліпази, може бути одержаний, наприклад, з використанням технологій рекомбінації нуклеотидів або може бути синтезований з мононуклеотидів чи коротших олігонуклеотидів. Для хімічного синтезу оліго- та полінуклеотидів за винаходом можуть бути використані автоматизовані синтезатори. Методики конструювання рекомбінантних нуклеотидних молекул відповідно до даного винаходу розкриті у [Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), яку цілком включено до даного опису]. Олігонуклеотиди, що кодуєть антисмислову РНК, комплементарну до послідовності старіння-індукованої ліпази, можуть бути одержані з використанням процедур, добре відомих фахівцям в цій галузі. Детальний опис таких методик наведений у [Maniatis, T. et al., Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression, Eds. Nierlich et al., Acad. Press, N.Y. (1976)].

В іншому варіанті втілення винаходу, інгібування експресії ендегенної рослинної старіння-індукованої ліпази є результатом співпригнічення шляхом надекспресії екзогенного гена чи фрагмента гена старіння-індукованої ліпази, введеного до рослинної клітини. У цьому варіанті втілення винаходу, до клітин вводять вектор, що кодує старіння-індуковану ліпазу в смисловій орієнтації, у такий саме спосіб, як було описано тут для антисмислових молекул. Переважно старіння-індукована ліпаза функціонально зв'язана із сильним конститутивним промотором, таким як, наприклад, промотор вірусу бородавчастої мозаїки фікусу чи CaMV35S.

Трансгенні рослини, виготовлені відповідно до даного винаходу, можуть бути одержані шляхом ДНК-трансформації з використанням будь-якого способу трансформації рослин, відомого фахівцям. Способи трансформації рослин включають пряму співкультивацію рослин, тканин чи клітин з *Agrobacterium tumefaciens* чи пряму інфекцію [Miki et al., Meth. in Plant Mol. Biol. and Biotechnology (1993), pp.67-88]; пряме перенесення генів у протопластах чи поглинання протопластів [Paszowski et al., EMBO J., 12:2717 (1984)]; електропорацію [Fromm et al., Nature 319:719 (1986)]; бомбардування частинками [Klein et al., BioTechnology, 6:559-563 (1988)]; ін'єкцію до меристематичних тканин паростків та рослин [De LaPena et al., Nature, 325: 274-276 (1987)]; ін'єкцію до протопластів культур клітин та тканин [Reich et al., BioTechnology, 4:1001-1004 (1986)].

Загалом в результаті процесу трансформації одержують цільну рослину. Рослини регенерують

з протопластів, калюсу, частин тканини чи експлантатів і тощо. Частини тканини, одержані з регено-рованих рослин, у яких було змінено експресію старіння-індукованої ліпази, такі як листя, квітки, плоди, насіння і т.п., включені до визначення "рослини", що використовується в цьому описі. Потомство, варіанти та мутанти регено-рованих рослин також включені до визначення "рослини".

Даний винахід також пропонує протеїн старіння-індукованої ліпази гвоздики чи *Arabidopsis*, кодований молекулами кДНК за винаходом, та протеїни, які виявляють кросреактивність з антитілом до протеїну гвоздики чи *Arabidopsis*. Такі протеїни мають амінокислотну послідовність, наведену у SEQ ID NO:2, зображену на Фігурі 1, виявляють спільну кросреактивність з антитілами до протеїну, представленого SEQ ID NO:2, мають амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO:19 (зображена на Фігурі 14), або виявляють спільну кросреактивність з антитілами до протеїну, представленого SEQ ID NO:19.

Протеїн старіння-індукованої ліпази гвоздики чи *Arabidopsis* чи його функціональні похідні краще продукуються за рекомбінантними технологіями, необов'язково у поєднанні зі способами хімічного синтезу. В одному варіанті втілення винаходу, старіння-індукована ліпаза експресується як злитий протеїн, що складається зі старіння-індукованої ліпази, злиної з мальтоза-зв'язувальним протеїном. Експресія клону, що кодує рекомбінантний злитий протеїн, дає злитий протеїн очікуваної молекулярної ваги, який гідролізує п-нітрофенілпальмітат, фосфоліпід та триацилгліцерин, що є показником ліпазної активності. Рекомбінантний протеїн старіння-індукованої ліпази виявляє за результатами аналізу способом вестерн-блотингу велику смугу після імуноблотування з антитілом до старіння-індукованої ліпази гвоздики. Вільна старіння-індукована ліпаза (50,2кДа), що вивільняється шляхом обробки злитого протеїну протеазою фактор Ха, також реагує з антитілом старіння-індукованої ліпази за результатами аналізу способом вестерн-блотингу (Фігура 3). Пошук мотиву амінокислотної послідовності старіння-індукованої ліпази показує присутність потенційного сайту N-міристоїлювання (Фігура 1) для ковалентного приєднання міростату за допомогою амідного зв'язка [див. Johnson et al., Ann. Rev. Biochem., 63:869-914 (1994); Towler et al., Ann. Rev. Biochem., 57:67-99 (1988); та R.J.A. Grand, Biochem. J., 258:625-638 (1989)]. Пошук протеїнового мотиву також показав, що старіння-індукована ліпаза гвоздики містить послідовність ITFAGHSLGA (SEQ ID NO:4), яка є консервативною консенсусною послідовністю ліпази (Таблиця 1). Консервативна консенсусна послідовність ліпази для різних рослин наведена у таблиці нижче.

Таблиця 1

Вид рослин	Консервативна ліпазна послідовність
Гвоздика	IT F A G H S L G A (SEQ ID NO:4)
Томат	IT F T G H S L G A (SEQ ID NO:3)
<i>Arabidopsis</i>	IT T C G H S L G A (SEQ ID NO:9)
<i>Ipomoea nil</i>	IT V T G H S L G S (SEQ ID NO:10)

Було показано, що протеїн старіння-індукованої ліпази за винаходом виявляє ліпазну активність за результатами аналізів *in vitro* та *in situ*. Для проведення вимірів *in vitro* використовували як субстрати п-нітрофенілпальмітат та соєвий фосфоліпід (40% фосфатидилхоліну та 60% інших фосфоліпідів), а продукти реакції - п-нітрофенол та вільні жирні кислоти, відповідно, вимірювали спектрофотометрично [Pencreac'h and Baratti, 1996; Nixon and Chan, 1979; Lin et al., 1983]. Ліпазну активність також вимірювали *in vitro* способом газової хроматографії з використанням модифікації способу, описаного Nixon and Chan (1979) та Lin et al. (1983). Реакційна суміш містила 100мМ трис-HCl (pH 8,0), 2,5мМ субстрату (трилінолеїн, соєвий фосфоліпід чи дилінолеїлфосфатидилхолін) та ферментний протеїн (100мкг) у кінцевому об'ємі 100мкл. Субстрати емульгували у 5% гуміарабіку перед доданням до реакційної суміші. Для цього субстрати розчиняли у хлороформі, додавали до розчину гуміарабіку і емульгували озвучуванням протягом 30с. Після емульгування хлороформ випаровували у потоці N<sub>2</sub>. Реакцію проводили при 25°C протягом змінних періодів часу тривалістю до 2 годин. Потім реакційну суміш екстрагували ліпідами і вільні жирні кислоти очищали способом ТШХ, дериватизували та кількісно визначали способом ГХ [McKegney et al., 1995].

Ліполітична ацилгідролазна активність вимірювалась *in situ*, як описано Furukawa et al. (1983), з модифікаціями Tsuboi et al. (1996). В цьому останньому аналізі *E.coli*, трансформовану повним клоном кДНК, що кодує старіння-індуковану ліпазу, вирощували у мінімальному сольовому середовищі з добавкою твін-40 чи твін-60, які обидва є складними ефірами довголанцюгових жирних кислот, як єдиного джерела карбону. Таким чином, карбон для бактеріального росту був доступний лише у тому випадку, якщо ефіри жирних кислот гідролізувалися ліпазою. Результати, за якими *E.coli*, трансформовані кДНК старіння-індукованої ліпази, росли у базальному середовищі з твін-40 чи твін-60 після початкової лаг-фази, у той час як контрольні культури нетрансформованої *E.coli* не росли, підтверджує ліпазну активність кодованого рекомбінантного протеїну (Фігура 5). Таким чином, старіння-індукована ліпаза вивільняє стеарат (твін-60) та пальмітат (твін-40) для одержання необхідного для росту карбону.

"Функціональні похідні" протеїну старіння-індукованої ліпази, описані в цьому документі, є фрагментами, варіантами, аналогами чи хімічними похідними старіння-індукованої ліпази, які зберігають принаймні частину активності старіння-індукованої ліпази або імунологічну кросреактивність з антитілом, специфічним до старіння-індукованої ліпази. Фрагмент протеїну старіння-індукованої ліпази стосується будь-якої складової частини молекули. Варіантні пептиди можуть бути одержані прямим хімічним синтезом, наприклад, з використанням способів, добре відомих фахівцям. Аналог старіння-індукованої ліпази стосується неприродного протеїну, по суті аналогічного цільному протеїну або його фрагменту. Хімічні похідні старіння-індукованої ліпази містять додаткові хімічні групи, які звичайно не входять до складу пеп-

тиду G38 або пептидного фрагмента. Модифікації пептиду старіння-індукованої ліпази чи його фрагмента можуть бути здійснені шляхом проведення реакції цільових амінокислотних залишків пептиду з органічним дериватизуючим агентом, здатним до реакції з обраними бічними ланцюгами чи термінальними залишками.

Протеїн чи пептид старіння-індукованої ліпази за винаходом може бути продукований шляхом, культивування клітини, трансформованої нуклеотидною послідовністю за даним винаходом (у смисловій орієнтації), надання клітині можливості для синтезу протеїну, а потім виділення протеїну у вигляді вільного протеїну чи злитого протеїну, залежно від використаного протоколу клонування, з культурального середовища чи з клітинних естрактів. За іншим варіантом, протеїн може бути продукований у безклітинній системі [Ranu et al., Meth. Enzymol.; 60:459-484 (1979)].

Після наведеного вище загального опису винаходу, він буде більш детально пояснений з посиланням на наведені далі приклади, які наведено для ілюстрації і не повинні вважатися такими, що обмежують даний винахід.

#### Приклад 1

Рослинні матеріали, використані для виділення кДНК ліпази гвоздики

Рослини гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved white Sim), які вирощувалися та утримувалися у теплиці, були використані для виділення нуклеотидної послідовності, що відповідає гену старіння-індукованої ліпази. Квіткову тканину у формі старіючих пелюстків квіток (з різних стадій розвитку) збирали у буфері або зберігали при -70°C до використання.

Цитозольні ліпідні частинки виділяли з пелюстків квіток гвоздики, зібраних безпосередньо перед початком старіння. Пелюстки гвоздики (25г/150мл буфера) гомогенізували при 4°C у буфері для гомогенізації (50мМ Epps - 0,25M сорбіту, pH 7,4, 10мМ EDTA, 2мМ EGTA, 1мМ PMSF, 1мМ бензамідину, 10мМ аміно-н-капронової кислоти та 4% полівінілполіпіролідону) протягом 45 секунд у пристрої Omnimixer та ще хвилину у гомогенізаторі Polytron. Гомогенат фільтрували крізь чотири шари сирної серветки і фільтрат центрифугували при 10000×g протягом двадцяти хвилин при 4°C. Надосадну рідину центрифугували протягом однієї години при 250000×g для ізоляції мікосомальних мембран. Ліпідні частинки були одержані з пост-мікосомальної надосадної рідини шляхом збирання частинок після флотаційного центрифугування за способом Hudak and Thompson (1997), *Physiol. Plant.*, 114:705-713. Надосадну рідину доводили до 10% (мас/об.) сахарози і 23мл цієї надосадної рідини наливали до пробірок центрифуги 60 Ti Beckman, заливали зверху 1,5мл буфера для ізоляції і центрифугували при 305000×g протягом 12 годин при 4°C. Частинки видаляли з верхнього шару буфера для ізоляції за допомогою пастерки. Три мл суспензії частинок завантажували у колонку Sepharose G-25, урівноважену стерильним фосфатно-сольовим буфером (PBS) (10мМ натрій-фосфатного буфера, pH 7,5, плюс 0,85% хлориду натрію) і суспензію елюювали стерильним PBS. Елюювали поровий об'єм, що містить частинки, і

концентрували за допомогою фільтра Centricon-10 (постачається фірмою Amicon) до концентрації протеїну 600мкг. Після цього ліпідні частинки використовували для генерування антитіл у кролях, інокульованих 300мкг частинок. Титр IgG крові визначали аналізом за способом вестерн-блотингу.

Ізоляція матричної РНК (мРНК)

Цільну РНК ізолювали з пелюстків квіток гвоздики стадії I, II, III чи IV, по суті як описано [Czomczynski and Sachi, Anal. Biochem., 162:156-159 (1987)]. Стисло, 15г тканини пелюстків заморожували у рідкому азоті і гомогенізували протягом 30с в буфері, що містить 4М гуанідинітиоціанату, 25мМ цитрату натрію, рН 7,0, 0,5% саркозилу та 0,1М  $\beta$ -меркаптоетанолу. До гомогенізованого зразка додавали 150мл насиченого водою фенолу, 30мл хлороформу та 15мл 2М NaOAc, рН 4,0. Зразок центрифугували при 10000 $\times$ g протягом десяти хвилин, водну фазу видаляли і нуклеїнові кислоти осаджували з неї за допомогою 150мл ізопропанолу. Зразок центрифугували протягом десяти хвилин при 5000 $\times$ g і осад промивали однократно 30мл 4М LiCl, екстрагували 30мл хлороформу і осаджували 30мл ізопропанолу, що містить 0,2М NaOAc, рН 5,0. РНК розчиняли у воді, обробленій діетилпікокарбонатом (DEPC), і зберігали при -70°C.

ПоліА<sup>+</sup> мРНК ізолювали із загальної РНК, використовуючи систему для ізоляції PolyA<sup>+</sup> tract mRNA Isolation System фірми Promega. ПоліА<sup>+</sup> мРНК використовували як матрицю для синтезу кДНК з використанням системи для синтезу кДНК ZAP Express<sup>®</sup> фірми Stratagene (La Jolla, Calif.).

Скринінг бібліотеки кДНК пелюстків гвоздики

Бібліотека кДНК була виготовлена з використанням мРНК, ізолюваної з пелюстків гвоздики стадії IV, розведеної до приблизно 5 $\times$ 10<sup>6</sup> бляшкоутворюючих одиниць (PFU)/мл та підданої імуоскринінгу антисироваткою до ліпідних частинок. Позитивні клони кДНК виділяли за допомогою системи фільтрації ExAssist<sup>®</sup> Helper Phage/SOLR та рециркуляризували у фагміді pBluescript<sup>®</sup> (Stratagene). Бібліотеку кДНК пелюстків гвоздики стадії III також піддавали скринінгу з використанням <sup>32</sup>P-міченого зонда з 19 пар основ (5'-ACCTACTAGGTTCCGCGTC-3') (SEQ ID NO:5). Позитивні клони кДНК вирізали з фарів та рециркуляризували у фагміді pBK-CMV<sup>®</sup> (Stratagene) з використанням методики, описаної в інструкції виробника. Повну кДНК (фрагмент 1,53 т.п.н.) вставляли до вектора pBK-CMV.

Скринінг бібліотеки кДНК листя Arabidopsis

Повний клон кДНК (1338 п.н.) гена старіння-індукованої ліпази Arabidopsis thaliana ізолювали шляхом скринінгу бібліотеки кДНК старіючого листя Arabidopsis. Зонд, що використовувався для скринінгу бібліотеки, одержували способом PCR з використанням як матриці бібліотеки старіючого листя. Праймери PCR були сконструйовані на основі геномної послідовності (U93215), що знаходиться у GenBank. Прямий праймер мав послідовність 5'-ATG TCT AGA GAA GAT ATT GCG CGG CGA-3' (SEQ ID NO:20), а зворотний - послідовність 5'-GAT GAG CTC GAC GGA GCT GAG AGA

GAT G-3' (SEQ ID NO:21). Продукт PCR субклонували до Bluescript для секвенування. Нуклеотидна та амінокислотна послідовності використаного продукту PCR показані на Фігурі 14.

Ізоляція плазмідної ДНК, секвенування ДНК

Для ізоляції плазмідної ДНК був використаний спосіб лужного лізису, описаний Sambrook et al. (вище). Повний позитивний клон кДНК секвенували з використанням способу дидезоксисеквенування [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467]. Відкриту рамку зчитування компонували та аналізували за допомогою пошукової системи BLAST (GenBank, Bethesda, MD), а порівняння первинної структури п'яти найбільш гомологічних протеїнів з розшифрованою амінокислотною послідовністю кодованого гена здійснювали за допомогою програми формування умов пошуку BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments Pattern-Induced Multiple Alignment Method (схема порівняння первинної структури численних послідовностей - спосіб індукування порівняння численних послідовностей) [див. F. Corpet, Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, (1987)]. Функціональні мотиви, присутні у розшифрованій амінокислотній послідовності, були ідентифіковані за допомогою MultiFinder.

Експресія ліпази як злитого протеїну

Фагміда pBK-CMV, що містить повну старіння-індуковану ліпазу гвоздики, гідролізували за допомогою EcoRI та XbaI, які вивільняли фрагмент ліпази розміром 1,53 т.п.н., який субклонували у гідролізований EcoRI та XbaI вектор злиття pMalc (New England Biolabs). Вектор pMalc, що містить старіння-індуковану ліпазу, позначений як pMLip, використовували для трансформування клітин E.coli BL-21 (DE3).

Злитий протеїн, кодований pMLip (продукт злиття старіння-індукованої ліпази та мальтоза-зв'язувального протеїну) ізолювали і очищали, як описано у [Sambrook et al. (вище) та Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York (1987), 16.4.1-16.4.3]. Стисло, клітини E.coli BL-21, трансформовані pMLip, ресуспендували у 3мл/г лізатному буфері (50мМ трис, рН 8,0, 100мМ NaCl та 1мМ EDTA), який містить 8мкл 50мМ PMSF та 80мкл 20мг/мл лізозиму на грам клітин, та інкубували протягом двадцяти хвилин при кімнатній температурі зі струшуванням. Потім додавали 80мкл 5% дезоксихолінової кислоти та 40 одиниць ДНКазі I і клітини струшували при кімнатній температурі до повного лізису клітин. Клітинні уламки осаджували центрифугуванням і ресуспендували у двох об'ємах лізатного буфера плюс 8М сечовина та 0,1мМ PMSF. Через одну годину додавали сім об'ємів буфера (50мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1мМ EDTA та 50мМ NaCl, рН 7,0) для нейтралізації суспензії. рН клітинної суспензії доводили до 8,0 за допомогою HCl і клітинні уламки осаджували центрифугуванням. Надосадну рідину діалізували проти буфера 20мМ трис, рН 8,0, 100мМ NaCl та 1мМ EDTA при 4°C протягом ночі. Продукт злиття мальтоза-зв'язувального протеїну-ліпази (Malip) очищали з використанням амілозної колонки (виробляється фірмою New England Biolab). Фракції, що містять злитий протеїн, розщеплювали протеа-

зою фактор Ха (1мкг/100мкг злитого протеїну) для відокремлення ліпази від продукту злиття. Як злитий протеїн, так і розщеплену ліпазу аналізували способами електрофорезу на поліакриламідному гелі з добавкою ДСН (SDS PAGE) та вестерн-блотингу. Як контроль використовували мальтоза-зв'язувальний протеїн, кодований рMalc. Результати представлені на Фігурі 3.

Гібридизація РНК гвоздики способом нозерн-блотингу

Десять мкг загальної РНК, ізольованої з квіток на стадіях I, II, III, IV, розділяли на 1% денатуруючих формальдегід-агарозних гелях та іммобілізували на найлонових мембранах. Як зонд для аналізу фільтрів використовували 1,53 т.п.н. EcoRI-XbaI фрагмент ліпази, мічений  $^{32}\text{P}$ -dCTP за допомогою готового до застосування набору з випадковим праймером (Boehringer Mannheim) ( $7 \times 10^7$  імпл/хв). Фільтри промивали один раз  $1 \times \text{SSC}$ , 0,1% ДСН при кімнатній температурі і три рази  $0,2 \times \text{SSC}$ , 0,1% ДСН при  $65^\circ\text{C}$ . Фільтри висушували і експонували на рентгенівській плівці протягом ночі при  $-70^\circ\text{C}$ . Результати показані на Фігурі 4.

Гібридизація РНК Arabidopsis способом нозерн-блотингу

Десять мкг загальної РНК, ізольованої з листя Arabidopsis на 2, 3, 4, 5 та 6 тижні росту, розділяли на 1% денатуруючих формальдегід-агарозних гелях та іммобілізували на найлонових мембранах. Як зонд для аналізу фільтрів використовували повний ген старіння-індукованої ліпази Arabidopsis, мічений  $^{32}\text{P}$ -dCTP за допомогою готового до застосування набору з випадковим праймером (Boehringer Mannheim) ( $7 \times 10^7$  імпл/хв). Фільтри промивали один раз  $1 \times \text{SSC}$ , 0,1% ДСН при кімнатній температурі і три рази  $0,2 \times \text{SSC}$ , 0,1% ДСН при  $65^\circ\text{C}$ . Фільтри висушували і експонували на рентгенівській плівці протягом ночі при  $-70^\circ\text{C}$ .

Ізоляція геномної ДНК і гібридизації способом саузерн-блотингу

Свіжо зрізані пелюстки гвоздики заморожували у рідкому азоті, розтирали в порошок і гомогенізували (2мл/г) з буфером для екстрагування (0,1М трис, рН 8,2, 50мМ EDTA, 0,1М NaCl, 2% ДСН та 0,1мг/мл протеїнази К) для ізоляції геномної ДНК. Гомогенізований матеріал інкубували при  $37^\circ\text{C}$  протягом десяти хвилин та екстрагували сумішшю фенол-хлороформ-ізоаміловий спирт (25:24:1). ДНК осаджували за допомогою NaOAc та ізопропанолу. Осад ДНК розчиняли у  $1 \times \text{TE}$ , рН 8,0, реекстрагували фенолом, повторно осаджували та ресуспендували у  $1 \times \text{TE}$ , рН 8,0.

Геномну ДНК гідролізували окремо узятими рестрикційними ендонуклеазами (BamHI, XbaI, XhoI, EcoRI, HindIII та Sall) і гідролізовану ДНК фракціонували на 1% агарозному гелі. Розділену ДНК переносили блотингом на найлонові мембрани і здійснювали гібридизації з використанням  $^{32}\text{P}$ -dCTP-міченого 1,53 т.п.н. фрагмента ліпази. Гібридизацію та промивку проводили за умов високої суворості ( $68^\circ\text{C}$ ,  $6 \times \text{SSC}$ ,  $2 \times$  реагент Денхарта, 0,1% ДСН), а також за умов низької суворості ( $42^\circ\text{C}$  для гібридизації та промивки) ( $6 \times \text{SSC}$ ,  $5 \times$  реагент Денхарта, 0,1% ДСН). Результати зображені на Фігурі 6. Як видно, зонд з ліпазної ДНК детектує лише один геномний фрагмент, вказуючи на те, що ген ліпази гвоздики є однокопійним геном.

Ферментативні аналізи ліпази

Ліполітичну ацилгідролазну активність очищеного злитого протеїну ліпази оцінювали спектрофотометрично з використанням як екзогенних субстратів п-нітрофенілпальмітату та соєвого фосфоліпиду. Для одного мальтоза-зв'язувального протеїну, що використовувався як контроль, не спостерігалось помітної ліпазної активності при використанні фосфоліпиду як субстрату (Таблиця 2). Коли п-нітрофенілпальмітат використовувався як субстрат тільки для мальтоза-зв'язувального протеїну, то детектувалася невелика кількість п-нітрофенолу, який є очікуваним продуктом ліпазної реакції, що відображає фонові рівні п-нітрофенолу у комерційному препараті п-нітрофенілпальмітату (Таблиця 2). Однак, у присутності очищеного злитого протеїну ліпази виявлялася очевидна сильна ліпазна активність у формі вивільнення вільних жирних кислот з фосфоліпиду та п-нітрофенолу з п-нітрофенілпальмітату (Таблиця 2).

Таблиця 2

Спектрофотометричні виміри ліполітичної ацилгідролазної активності мальтоза-зв'язувального протеїну та злитого протеїну ліпази, експресованого у E.coli та очищеного хроматографією на амілозній колонці

Були використані два субстрати - п-нітрофенілпальмітат та соєвий фосфоліпід.

Активність виражали за показником утвореного продукту (п-нітрофенілпальмітату та вільна жирна кислота з соєвого фосфоліпиду)

Наведені середні значення  $\pm$  стандартна похибка для  $n=3$  паралельних дослідів.

Вид протеїну	Продукт	
	рNPP п-нітрофеніл (нмоль/мг/хв)	вільна жирна кислота (нмоль/мг протеїну/хв)
Мальтоза-зв'язувальний протеїн	0,71 $\pm$ 0,02	н.в.*
Злитий протеїн ліпази	12,01 $\pm$ 1,81	46,75 $\pm$ 1,24

н.в. - не виявлено

В інших експериментах, ферментативну активність злитого протеїну ліпази оцінювали способом газової хроматографії, яка є методикою, що

дозволяє кількісне вимірювання та ідентифікацію вільних жирних кислот, вивільнених з субстрату. Як субстрати використовувалися трилінолеїн, соє-



вий фосфоліпід та дилінолеїлфосфатидилхолін, а деестерифіковані жирні кислоти очищали тонкошаровою хроматографією перед проведенням аналізу способом газової хроматографії. За результатами спектрофотометричного аналізу (Таблиця 2), тільки для мальтоза-зв'язувального протеїну не спостерігалось виявлюваної ліпазної активності з соєвим фосфоліпідом чи з дилінолеїлфосфатидилхоліном, що свідчить про те, що ці субстрати по суті не містять деестерифікованих жирних кислот (Таблиця 3). Однак, при використанні як джерела ферменту злитого протеїну ліпа-

зи, з екстракту соєвого фосфоліпиду були деестерифіковані пальмітинова, стеаринова та ліолева кислоти, і ліолева кислота була деестерифікована з дилінолеїлфосфатидилхоліну (Таблиця 3). На відміну від фосфоліпідного субстрату, виявлені рівні вільної ліолевої кислоти спостерігалися у трилінолеїні, але рівні вільної ліолевої кислоти істотно зростали у присутності злитого протеїну ліпази, вказуючи на те, що ліпаза є здатною також деестерифікувати жирні кислоти з триацилгліцерину (Таблиця 3).

Таблиця 3

Виміри способом ГХ ліполітичної ацилгідролазної активності мальтоза-зв'язувального протеїну та злитого протеїну ліпази, експресованого у *E.coli* та очищеного хроматографією на амліозній колонці

Субстрат		Продукти (мкг/мг протеїну) <sup>1</sup>	
		Мальтоза-зв'язувальний протеїн	Злитий протеїн ліпази
Трилінолеїн <sup>2</sup>	Ліолева кислота (18:2)	15,9±0,75	33,4±1,58
Соєві фосфоліпіди <sup>3</sup>	Пальмітинова кислота (16:0)	н.в. <sup>4</sup>	4,80
	Стеаринова кислота (18:0)	н.в.	9,68
	Ліолева кислота (18:2)	н.в.	5,80
Дилінолеїл-фосфатидилхолін <sup>3</sup>	Ліолева кислота (18:2)	н.в.	20,00

<sup>1</sup> Реакцію проводили протягом 2 годин, і вона впродовж цього періоду не була безперервно лінійною.

<sup>2</sup> Наведено середнє ± стандартна похибка для n=3 паралельних дослідів.

<sup>3</sup> Одиничний експеримент.

<sup>4</sup> Не виявлено.

Ліпазна активність протеїну, одержаного шляхом експресії ліпазної кДНК у *E.coli*, вимірювали *in vivo*, як описано у [Tsuboi et al., Infect. Immunol., 64:2936-2940 (1996); Wang et al., Biotech., 9:741-746 (1995); та G.Sierra, J. Microbiol. and Serol., 23:15-22 (1957)]. Окрему колонію клітин *E.coli* BL-21, трансформовану pMal, та іншу колонію *E.coli* BL-21, трансформовану pMLip, інокулювали у базальне сольове середовище (pH 7,0), яке містить (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,3), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,4), (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (2,0), MgCl<sub>2</sub> (0,16), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,001), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,0006), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,026) та NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,002). Субстрат - твін-40 (поліоксіетиленсорбітанмонопальмітат) чи твін-60 (поліоксіетиленсорбітанмоностеарат) - додавали в концентрації 1%. Ріст бактеріальних клітин при 37°C зі струшуванням контролювали шляхом вимірів оптичної густини на 600нм (Фігура 5). Як видно на Фігурі 5, клітини *E.coli*, трансформовані pMLip, були здатні до росту у базальному середовищі з добавкою твін-40/твін-60 після початкового лаг-періоду. Однак, клітини *E.coli*, трансформовані pMal, не ростуть у середовищі з добавкою твіну.

#### Приклад 2

Етиленова індукція гена старіння-індукованої ліпази гвоздики

Квітки гвоздики стадії II та живці гвоздики обробляли 0,5млн<sup>-1</sup> етилену у герметизованій камері протягом 15 годин. З пелюстків квіток стадії II та з листя оброблених живців екстрагували РНК, а також з пелюстків та листя квіток та живців необробленої гвоздики, як описано далі.

Рослини *Arabidopsis* обробляли 50мкМ етефону у герметизованій камері протягом одного, двох чи трьох днів. РНК екстрагували з обробленого етефоном листя рослин таким чином.

Квітки чи листя (1 квітка чи 5г листів) розмелювали у рідкому азоті. Розмелений порошок змішували з 30мл гуанідинієвого буфера (4М гуанідинійізотіоціанат, 2,5мМ NaOAc, pH 8,5, 0,8% β-меркаптоетанолу). Суміш фільтрували крізь чотири шари сирної серветки і центрифугували при 10000×g протягом 30 хвилин при 4°C. Потім надосадну рідину піддавали центрифугуванню у градієнті густини хлориду цезію при 26000×g протягом 20 годин. Осад РНК промивали 75% етанолом, ресуспендували у 600мкл DEPC-обробленої води і осаджували РНК при -70°C за допомогою 0,75мл 95% етанолу та 30мкл 3М NaOAc. Десять мкг РНК гвоздики або *Arabidopsis* фракціонували на 1,2% денатуруючому формальдегід-агарозному гелі і переносили на найлонову мембрану. Як зонд для мембрани, що містить РНК гвоздики, використовували випадково праймовану <sup>32</sup>P-dCTP-мічену повну кДНК старіння-індукованої ліпази гвоздики (SEQ ID NO:1) при 42°C протягом ночі. Як зонд для мембрани, що містить РНК *Arabidopsis*, використовували випадково праймовану <sup>32</sup>P-dCTP-мічену повну кДНК ліпази *Arabidopsis* при 42°C протягом ночі. Потім мембрани промивали один раз у 1× SSC, що містить 0,1% ДСН, при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім три рази у 0,2× SSC, що містить 0,1% ДСН при 65°C по 15 хвилин кожний раз. Мембрани експонували на рентгенівській плівці протягом ночі при -70°C.

Результати зображені на Фігурі 9 (гвоздика) та Фігурі 16 (*Arabidopsis*: ланка 1 - одностенна обробка; ланка 2 - двостенна обробка; ланка 3 - тростенна обробка). Можна побачити, що транскрипція ліпази гвоздики та ліпази *Arabidopsis* індукуються у квітках та/або листі етиленом.

#### Приклад 3

Одержання продукту PCR томата з використанням праймерів ліпази гвоздики

Неповну послідовність старіння-індукованої ліпази з геномної ДНК томата, одержаної з листя томата, генерували способом "гніздового" (nested) PCR з використанням пари олігонуклеотидних праймерів, сконструйованих з послідовності старіння-індукованої ліпази гвоздики. 5'-праймер є 19-мером, який має послідовність 5'-CTCTAGACTATGAGTGGGT (SEQ ID NO:7); 3'-праймер є 18-мером, що має послідовність CGACTGGCACAACTTCCA-3' (SEQ ID NO:8). Полімеразну ланцюгову реакцію з використанням геномної ДНК томата проводилась таким чином:

Компоненти реакції:

Геномна ДНК	100мкг
dNTP (10мМ кожного)	1мкл
MgCl <sub>2</sub> (5мМ) + 10× буфер	5мкл
Праймери 1 та 2 (20мМ кожного)	0,5мкл
Taq ДНК-полімераза	1,25од.
Реакційний об'єм	50мкл

Параметри реакції:

94°C протягом 3хв.

94°C/1хв., 48°C/1хв., 72°C/2хв., 45 циклів

72°C протягом 15хв.

Неповна послідовність томата, одержана способом PCR, має нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:6 (Фігура 10) і розшифровану амінокислотну послідовність, представлену на Фігурі 10. Неповна послідовність включає інтрон (Фігура 10, маленькі літери), розсіяний між двома кодуючими послідовностями. Послідовність томата містить консервативну консенсусну послідовність ліпази ITFTGHSLGA (SEQ ID NO:3).

Послідовність томата має ступінь ідентичності послідовності 53,4% з послідовністю старіння-індукованої ліпази гвоздики та ступінь ідентичності послідовності 43,5% з ліпазою *Arabidopsis*, остання з яких має ступінь ідентичності послідовності 44,3% з послідовністю гвоздики.

#### Приклад 4

Вплив заморозків на цілісність клітинної мембрани рослин томата

Рослини томата піддавали дії заморозку протягом 48 годин при температурі від 7°C до 8°C, а потім повертали до кімнатної температури протягом 24 годин. Вплив заморозків на листя оцінювали шляхом вимірювання кількості витеклого електроліту (мкСм).

Конкретно, 1г тканини листів нарізали у пробірку на 50мл, споліскували дистильованою водою, і додавали 40мл деіонізованої води. Пробірки закривали пробками і обертали при кімнатній температурі протягом 24 годин. Показники провідності

(мкСм), що відображають витікання електроліту, визначали з інтервалами у 6 та 24 години для контрольної та ушкодженої заморозками тканини листів. З Фігури 11 зрозуміло, що витікання електроліту, яке відображає ушкодження мембран, відбувається під час періоду повторного нагрівання у тканині листів, ушкоджених заморозком.

Аналіз способом нозерн-блотингу РНК, одержаної з ушкоджених заморозком листів томата

Ізолювали загальну РНК з 15г листів неушкоджених заморозком рослин томата (контроль) та ушкоджених заморозком рослин томата, які були повернені до кімнатної температури, в моменти часу 0, 6 та 24 години. Екстрагування РНК здійснювали, як описано у Прикладі 3. 10мкг РНК з кожного зразка розділяли на 1,2% денатуруючому формальдегідвмісному гелі і переносили на найлонову мембрану. Мембрану обробляли <sup>32</sup>P-dCTP-міченим зондом (SEQ ID NO:3), а потім промивали за таких саме умов, як описано у Прикладі 3. Результати зображені на Фігурі 12.

Як можна побачити з авторадіограми (Фігура 12Б), експресія гена ліпази томата індукуються заморозками, а характер індукування гена корелює з підвищеним витіканням електроліту з ушкоджених заморозком листів (Фігура 11).

#### Приклад 5

Одержання трансгенних рослин, що експресують ген старіння-індукованої ліпази в антисмисловій орієнтації

*Agrobacteria* були трансформовані за допомогою бінарного вектора pKYLX71, який містить повний ген старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*, що експресується в антисмисловій орієнтації під контролем подвійного промотору 35S. Рослини *Arabidopsis* були трансформовані за допомогою зазначених *Agrobacteria* шляхом вакуумної фільтрації, і трансформоване насіння одержаних рослин T<sub>0</sub> піддавали селекції ампіциліном.

Вирощували рослини T<sub>1</sub> в умовах теплиці, разом з рослинами *Arabidopsis* дикого типу. Спостерігали за різницею у розмірі листів, загальному розмірі рослин, врожаї насіння та старінням листя між трансгенними рослинами і рослинами дикого типу у часі. Відмінності проілюстровані Фігурами 17, 18, 19 та 20.

#### Приклад 6

Знижене продукування старіння-індукованої ліпази у трансгенних рослин Загальний протеїн, ізолюваний з листя *Arabidopsis* дикого типу у віці чотирьох тижнів та відповідних трансгенних рослин, одержаних, як описано у Прикладі 5, перенесли на нейлонову мембрану і обробляли як зондом антитілом, що виробляється проти протеїну старіння-індукованої ліпази *Arabidopsis*. На Фігурі 21 показані результати аналізу способом вестерн-блотингу (на ланки 1 та 2 було внесено по 9 мкг протеїну, а на ланки 3 та 4 - по 18мкг протеїну). Експресія старіння-індукованої ліпази у трансгенних рослин була зниженою.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ТОМПСОН, Джон, Е.  
ВОНГ, Тзанн-Уей  
ХУДАК, Каталіна  
ХОНГ, Ювен

<120> ДНК, ЩО КОДУЄ РОСЛИННУ ЛІПАЗУ, ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ  
ТА СПОСІБ КОНТРОЛЮ СТАРІННЯ У РОСЛИН

<130> 10799/14

<140> РСТ/US01/19385

<141> 2001-06-19

<150> 09/610,104

<151> 2000-07-05

<150> 09/597,774

<151> 2000-06-09

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1537

<212> ДНК

<213> *Dianthus caryophyllus*

<400> 1

```
gcacgagcca ttccaaaact ccttacacca ctcaaaacta ttccaacatg gctgcagaag 60
cccaaccttt aggcctctca aagcccggcc caacatggcc cgaactcctc ggggtccaacg 120
cttggggccgg gctactaaac ccgctcaacg atgagctccg tgagctcctc ctacgctgcg 180
gggacttctg ccaggtgaca tacgacacct tcataaacga ccagaactcg tcctactgcg 240
gcagcagccg ctacgggaag gcggacctac ttcataagac cgccttcccg gggggcgag 300
accggtttga cgtgggtggc tacttgtagc ccactgcaa ggtcagcgct ccagagcggt 360
ttctgctgaa gtcgaggtcg agggagaagt gggatagga atcgaattgg attgggtatg 420
tcgtgggtgc gaatgacgag acgagtcggg tggcgggacg aagggaggtg tatgtggtgt 480
ggagagggac ttgtagggat tatgagtggt ttgatgttct tgggtgctca cttgagctcg 540
ctcatccttt gttacgcact caacaaacta ctcatgttga aaaggtggaa aatgaggaaa 600
agaagagcat tcataaatca agttggtacg actgtttcaa tatcaaccta ctagggtccg 660
cgtccaaaga caaaggaaaa ggaagcgacg acgacgatga tgacgacccc aaagtgatgc 720
aaggttggtg gacaatatac acatcggagg atcccaaatc acccttcaca aaactaagt 780
caagaacaca acttcagacc aaactcaaac aactaatgac aaaatacaaa gacgaaaccc 840
taagcataac attcgcgggt cacagcctag gcgcgacact atcagtcgtg agcgccttcg 900
acatagtgga gaatctcacg accgagatcc cagtcacggc cgtgggtctc ggggtgcccc 960
aagtaggcaa caaaaaattc caacaactct tcgactcgta cccaaaccta aatgtcctcc 1020
atgtaaggaa tgtcatcgac ctgatccctc tgtatcccgt gaaactcatg gggtacgtga 1080
acataggaat cgagctggag atcgactcga ggaagtcgac ctttctaaag gactcgaaaa 1140
acccgagtga ttggcataat ttgcaagcaa tattgcatgt tgtaagtggg tggcatgggg 1200
ttaaggggga gtttaagggt gtaaataaga gaagtgttgc attggttaat aagtcatgtg 1260
attttcttaa ggaagaatgt ttggttcctc cagcttggtg ggttgtgcag aacaaaggga 1320
tggttttgaa taaggatggg gagtgggttt tggctcctcc tgaggaagat cctactcctg 1380
aatttgattg ataattttc atcatgtttt atatttttat aaattttact aaattttacat 1440
gacaatttat gggactaagt tactttattt tatgtttatt atatttgaaa tgtgttttaa 1500
gttacataaa attgcaatta gttttaaaaa aaaaaaa 1537
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

<213> *Dianthus caryophyllus*

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ala Glu Ala Gln Pro Leu Gly Leu Ser Lys Pro Gly Pro Thr  
 1 5 10 15

Trp Pro Glu Leu Leu Gly Ser Asn Ala Trp Ala Gly Leu Leu Asn Pro  
 20 25 30

Leu Asn Asp Glu Leu Arg Glu Leu Leu Arg Cys Gly Asp Phe Cys  
 35 40 45

Gln Val Thr Tyr Asp Thr Phe Ile Asn Asp Gln Asn Ser Ser Tyr Cys  
 50 55 60

Gly Ser Ser Arg Tyr Glu Lys Ala Asp Leu Leu His Lys Thr Ala Phe  
 65 70 75 80

Pro Gly Gly Ala Asp Arg Phe Asp Val Val Ala Tyr Leu Tyr Ala Thr  
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Val Pro Glu Ala Phe Leu Leu Lys Ser Arg Ser Arg  
 100 105 110

Glu Lys Trp Asp Arg Glu Ser Asn Trp Ile Gly Tyr Val Val Val Ser  
 115 120 125

Asn Asp Glu Thr Ser Arg Val Ala Gly Arg Arg Glu Val Tyr Val Val  
 130 135 140

Trp Arg Gly Thr Cys Arg Asp Tyr Glu Trp Val Asp Val Leu Gly Ala  
 145 150 155 160

Gln Leu Glu Ser Ala His Pro Leu Leu Arg Thr Gln Gln Thr Thr His  
 165 170 175

Val Glu Lys Val Glu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Ile His Lys Ser Ser  
 180 185 190

Trp Tyr Asp Cys Phe Asn Ile Asn Leu Leu Gly Ser Ala Ser Lys Asp  
 195 200 205

Lys Gly Lys Gly Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Pro Lys Val Met  
 210 215 220

Gln Gly Trp Met Thr Ile Tyr Thr Ser Glu Asp Pro Lys Ser Pro Phe  
 225 230 235 240

Thr Lys Leu Ser Ala Arg Thr Gln Leu Gln Thr Lys Leu Lys Gln Leu  
 245 250 255

Met Thr Lys Tyr Lys Asp Glu Thr Leu Ser Ile Thr Phe Ala Gly His  
 260 265 270

Ser Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Val Ser Ala Phe Asp Ile Val Glu

41										85528										42										
275										280										285										
Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Val	Phe	Gly	Cys	Pro															
290						295						300																		
Lys	Val	Gly	Asn	Lys	Lys	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Asp	Ser	Tyr	Pro	Asn															
305					310					315					320															
Leu	Asn	Val	Leu	His	Val	Arg	Asn	Val	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Leu	Tyr															
				325					330					335																
Pro	Val	Lys	Leu	Met	Gly	Tyr	Val	Asn	Ile	Gly	Ile	Glu	Leu	Glu	Ile															
			340					345					350																	
Asp	Ser	Arg	Lys	Ser	Thr	Phe	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Pro	Ser	Asp															
		355					360					365																		
Trp	His	Asn	Leu	Gln	Ala	Ile	Leu	His	Val	Val	Ser	Gly	Trp	His	Gly															
		370				375					380																			
Val	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Val	Asn	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Val															
385					390					395				400																
Asn	Lys	Ser	Cys	Asp	Phe	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Pro	Ala															
				405					410				415																	
Trp	Trp	Val	Val	Gln	Asn	Lys	Gly	Met	Val	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu															
		420					425						430																	
Trp	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Glu	Glu	Asp	Pro	Thr	Pro	Glu	Phe	Asp																
		435				440						445																		

<210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 3  
 Ile Thr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Dianthus caryophyllus*

<400> 4  
 Ile Thr Phe Ala Gly His Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> *Dianthus caryophyllus*

43	85528	44
<400> 5		
acctactagg ttccgcgtc		19
<210> 6		
<211> 923		
<212> ДНК		
<213> Lycopersicon esculentum		
<220>		
<221> CDS		
<222> (join(6..513, 845..921))		
<400> 6		
ctcta gac tat gag tgg gtg gat gtt tta ggt gct cgt cct gat tca		47
Asp Tyr Glu Trp Val Asp Val Leu Gly Ala Arg Pro Asp Ser		
1 5 10		
gct gac tct ctt ctt cat cct aaa tct ctc caa aaa ggc att aac aac		95
Ala Asp Ser Leu Leu His Pro Lys Ser Leu Gln Lys Gly Ile Asn Asn		
15 20 25 30		
aag aac gat gag gat gag gac gag gac gag gat gag atc aaa gta atg		143
Lys Asn Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ile Lys Val Met		
35 40 45		
gat ggg tgg ctt aag atc tac gtc tca agt aac ccg aag tgg tct ttc		191
Asp Gly Trp Leu Lys Ile Tyr Val Ser Ser Asn Pro Lys Ser Ser Phe		
50 55 60		
acg aga cta agt gca aga gaa caa ctt caa gca aag att gaa aag tta		239
Thr Arg Leu Ser Ala Arg Glu Gln Leu Gln Ala Lys Ile Glu Lys Leu		
65 70 75		
aga aat gag tat aaa gat gag aat ttg agc ata act ttt aca ggg cat		287
Arg Asn Glu Tyr Lys Asp Glu Asn Leu Ser Ile Thr Phe Thr Gly His		
80 85 90		
agt ctt ggt gct agc tta gct gtt tta gct tca ttt gat gtg gtt gaa		335
Ser Leu Gly Ala Ser Leu Ala Val Leu Ala Ser Phe Asp Val Val Glu		
95 100 105 110		
aat ggt gtg cca gtt gat att cca gta tct gca att gta ttt ggt agt		383
Asn Gly Val Pro Val Asp Ile Pro Val Ser Ala Ile Val Phe Gly Ser		
115 120 125		
cca caa gtt ggg aat aag gca ttc aat gaa aga atc aag aaa ttc tca		431
Pro Gln Val Gly Asn Lys Ala Phe Asn Glu Arg Ile Lys Lys Phe Ser		
130 135 140		
aac ttg aat atc tta cat gtt aag aac aag att gat ctc att acc ctt		479
Asn Leu Asn Ile Leu His Val Lys Asn Lys Ile Asp Leu Ile Thr Leu		
145 150 155		
tac cca agt gct ctg ttt ggg tat gtg aat tca g gtattgaagg		523
Tyr Pro Ser Ala Leu Phe Gly Tyr Val Asn Ser		
160 165		

45	85528	46	
aaaagatcat tacaattttg agctagattt ctcatatcgt cacactcaac taacagttat			583
tatatgagaa agtcactttc tttgtgaaaa aattgaatca acttttggaa ataatagtag			643
ttgagtgacc atatgagaaa tcaacactct actaacttta tgctataaga gaataggtta			703
aggtccatat gtttatactg tctgttcaat tagaatcata aaagtattac tagttaaatt			763
tgactacaat cttatgtaga catgaataaa ataaatccta cataaataag atttcctaca			823
actttaatga ttcttcaaca g	gt ata gag cta gtc atc gat agc aga aag		873
	Gly Ile Glu Leu Val Ile Asp Ser Arg Lys		
	170 175		
tct ccg agt tta aag gat tca aaa gac atg ggc gac tgg cac aac ctc			921
Ser Pro Ser Leu Lys Asp Ser Lys Asp Met Gly Asp Trp His Asn Leu			
180 185 190 195			
ca			923
<210> 7			
<211> 19			
<212> ДНК			
<213> Штучна послідовність			
<220>			
<223> Опис штучної послідовності: Праймер			
<400> 7			
ctctagacta tgagtgggt			19
<210> 8			
<211> 18			
<212> ДНК			
<213> Штучна послідовність			
<220>			
<223> Опис штучної послідовності: Праймер			
<400> 8			
cgactggcac aacctcca			18
<210> 9			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis sp.			
<400> 9			
Ile Thr Thr Cys Gly His Ser Leu Gly Ala			
1 5 10			
<210> 10			
<211> 10			
<212> PRT			

<213> Ipomoea nil

<400> 10

Ile Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ser  
1 5 10

<210> 11

<211> 447

<212> PRT

<213> Dianthus caryophyllus

<400> 11

Met Ala Ala Glu Ala Gln Pro Leu Gly Leu Ser Lys Pro Gly Pro Thr  
1 5 10 15

Trp Pro Glu Leu Leu Gly Ser Asn Ala Trp Ala Gly Leu Leu Asn Pro  
20 25 30

Leu Asn Asp Glu Leu Arg Glu Leu Leu Arg Cys Gly Asp Phe Cys  
35 40 45

Gln Val Thr Tyr Asp Thr Phe Ile Asn Asp Gln Asn Ser Ser Tyr Cys  
50 55 60

Gly Ser Ser Arg Tyr Gly Lys Ala Asp Leu Leu His Lys Thr Ala Phe  
65 70 75 80

Pro Gly Gly Ala Asp Arg Phe Asp Val Val Ala Tyr Leu Tyr Ala Thr  
85 90 95

Ala Lys Val Ser Val Pro Glu Ala Phe Leu Leu Lys Ser Arg Ser Arg  
100 105 110

Glu Lys Trp Asp Arg Glu Ser Asn Trp Ile Gly Tyr Val Val Val Ser  
115 120 125

Asn Asp Glu Thr Ser Arg Val Ala Gly Arg Arg Glu Val Tyr Val Val  
130 135 140

Trp Arg Gly Thr Cys Arg Asp Tyr Glu Trp Val Asp Val Leu Gly Ala  
145 150 155 160

Gln Leu Glu Ser Ala His Pro Leu Leu Arg Thr Gln Gln Thr Thr His  
165 170 175

Val Glu Lys Val Glu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Ile His Lys Ser Ser  
180 185 190

Trp Tyr Asp Cys Phe Asn Ile Asn Leu Leu Gly Ser Ala Ser Lys Asp  
195 200 205

Lys Gly Lys Gly Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Pro Lys Val Met  
210 215 220

Gln Gly Trp Met Thr Ile Tyr Thr Ser Glu Asp Pro Lys Ser Pro Phe  
225 230 235 240



49					85528					50					
Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Gln	Leu	Gln	Thr	Lys	Leu	Lys	Cys	Leu
				245					250					255	
Met	Thr	Lys	Tyr	Lys	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Gly	His
			260					265					270		
Ser	Leu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Ser	Ala	Phe	Asp	Ile	Val	Glu
		275					280					285			
Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Val	Phe	Gly	Cys	Pro
	290					295					300				
Lys	Val	Gly	Asn	Lys	Lys	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Asp	Ser	Tyr	Pro	Asn
305					310					315					320
Leu	Asn	Val	Leu	His	Val	Arg	Asn	Val	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Leu	Tyr
				325					330					335	
Pro	Val	Lys	Leu	Met	Gly	Tyr	Val	Asn	Ile	Gly	Ile	Glu	Leu	Glu	Ile
			340					345					350		
Asp	Ser	Arg	Lys	Ser	Thr	Phe	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Pro	Ser	Asp
		355					360					365			
Trp	His	Asn	Leu	Gln	Ala	Ile	Leu	His	Val	Val	Ser	Gly	Trp	His	Gly
	370					375					380				
Val	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Val	Asn	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Val
385					390					395					400
Asn	Lys	Ser	Cys	Asp	Phe	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Pro	Ala
			405						410					415	
Trp	Trp	Val	Val	Gln	Asn	Lys	Gly	Met	Val	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu
			420					425					430		
Trp	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Glu	Glu	Asp	Pro	Thr	Pro	Glu	Phe	Asp	
		435				440						445			

<210> 12

<211> 418

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

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

51					85528					52						
Thr	Glu	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Ala	Ser	Ile	Tyr	Ser	Arg	Lys	Asp	Phe	
65					70					75					80	
Phe	Ala	Lys	Val	Gly	Leu	Glu	Ile	Ala	His	Pro	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Lys	
				85					90					95		
Val	Thr	Lys	Phe	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asp	Ile	His	Val	Pro	Glu	Ser	
			100					105					110			
Phe	Leu	Leu	Phe	Pro	Ile	Ser	Arg	Glu	Gly	Trp	Ser	Lys	Glu	Ser	Asn	
			115				120					125				
Trp	Met	Gly	Tyr	Val	Ala	Val	Thr	Asp	Asp	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	
	130					135					140					
Gly	Arg	Arg	Asp	Ile	Val	Val	Ser	Trp	Arg	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Leu	
145				150						155					160	
Glu	Trp	Val	Glu	Asp	Phe	Glu	Phe	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Ile	Lys	Ile	
				165					170					175		
Phe	Gly	Glu	Arg	Asn	Asp	Gln	Val	Gln	Ile	His	Gln	Gly	Trp	Tyr	Ser	
			180					185					190			
Ile	Tyr	Met	Ser	Gln	Asp	Glu	Arg	Ser	Pro	Phe	Thr	Lys	Thr	Asn	Ala	
		195					200					205				
Arg	Asp	Gln	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Glu	Lys	Tyr	Lys	
		210				215					220					
Asp	Glu	Glu	Val	Ser	Ile	Thr	Ile	Cys	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ala	Ala	
225				230					235					240		
Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Ala	Ile	Asp	Ile	Val	Ala	Asn	Gly	Tyr	Asn	Arg	
				245					250					255		
Pro	Lys	Ser	Arg	Pro	Asp	Lys	Ser	Cys	Pro	Val	Thr	Ala	Phe	Val	Phe	
			260					265					270			
Ala	Ser	Pro	Arg	Val	Gly	Asp	Ser	Asp	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Ser	Gly	
		275				280						285				
Leu	Glu	Asp	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Thr	Arg	Asn	Leu	Phe	Asp	Val	Ile	
	290					295					300					
Pro	Ile	Tyr	Pro	Pro	Ile	Gly	Tyr	Ser	Glu	Val	Gly	Asp	Glu	Phe	Pro	
305				310					315					320		
Ile	Asp	Thr	Arg	Lys	Ser	Pro	Tyr	Met	Lys	Ser	Pro	Gly	Asn	Leu	Ala	
				325					330					335		
Thr	Phe	His	Cys	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	His	Gly	Val	Ala	Gly	Thr	Gln	
			340					345					350			
Gly	Thr	Asn	Lys	Ala	Asp	Leu	Phe	Arg	Leu	Asp	Val	Glu	Arg	Ala	Ile	
		355				360						365				
Gly	Leu	Val	Asn	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Leu	Lys	Asp	Glu	Cys	Met	Val	

53	85528	54
370	375	380
Pro Gly Lys Trp Arg Val Leu Lys Asn Lys Gly Ala Gln Gln Asp Asp		
385	390	395 400
Gly Ser Trp Glu Leu Val Asp His Glu Ile Asp Asp Asn Glu Asp Leu		
	405	410 415
Asp Phe		
<210> 13		
<211> 401		
<212> PRT		
<213> Ipomoea sp.		
<400> 13		
Met Ser Gly Ile Ala Lys Arg Trp Lys Val Leu Ser Gly Ser Asp Asn		
1	5	10 15
Trp Glu Gly Leu Leu Glu Pro Leu Asp Ser Asp Leu Arg Arg Tyr Leu		
	20	25 30
Ile His Tyr Gly Thr Met Val Ser Pro Ala Thr Asp Ser Phe Ile Asn		
	35	40 45
Glu Ala Ala Ser Lys Asn Val Gly Leu Pro Arg Tyr Ala Arg Arg Asn		
	50	55 60
Leu Leu Ala Asn Cys Gly Leu Val Lys Gly Asn Pro Phe Lys Tyr Glu		
	65	70 75 80
Val Thr Lys Tyr Phe Tyr Ala Pro Ser Thr Ile Pro Leu Pro Asp Glu		
	85	90 95
Gly Tyr Asn Val Arg Ala Thr Arg Ala Asp Ala Val Leu Lys Glu Ser		
	100	105 110
Asn Trp Asn Gly Tyr Val Ala Val Ala Thr Asp Glu Gly Lys Val Ala		
	115	120 125
Leu Gly Arg Arg Asp Ile Leu Ile Val Trp Arg Gly Thr Ile Arg Lys		
	130	135 140
Ser Glu Trp Asn Glu Asn Leu Thr Phe Trp Phe Val Lys Ala Pro Leu		
	145	150 155 160
Phe Phe Gly Gln Asn Ser Asp Pro Leu Val His Lys Gly Trp Tyr Asp		
	165	170 175
Met Tyr Thr Thr Ile Asn Gln Asp Ser Gln Leu Asn Glu Lys Ser Ala		
	180	185 190
Arg Asp Gln Ile Arg Glu Glu Val Ala Arg Leu Val Glu Leu Tyr Lys		
	195	200 205
Asp Glu Asp Ile Ser Ile Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ser Ser		

55					85528					56					
210					215					220					
Met	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Asn	Asn
225					230					235					240
Asn	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Lys	Val
				245					250					255	
Gly	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Asn	Gln	Gln	Asn	Leu	Arg
			260					265					270		
Ala	Leu	Arg	Ile	Ser	Asp	Val	Asn	Asp	Ile	Val	Thr	Ala	Val	Pro	Pro
			275				280					285			
Phe	Gly	Trp	Lys	Glu	Cys	Asp	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val
	290					295					300				
Gly	Val	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Ser	Lys	Lys	Ser	His	Tyr	Leu	Lys	Pro
305					310					315					320
Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Ser	Thr	His	Asp	Leu	Met	Leu	Tyr	Met	His	Ala
			325						330					335	
Ile	Asp	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Phe	Glu	Arg	Gln	Glu	Asp
			340					345					350		
Phe	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Asn	Lys	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Leu	Lys	Ala	Glu
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ile	Pro	Ile	Gly	Trp	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Lys	Gly	Met	Gln
	370					375					380				
Gln	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Asp	Asp	His	Glu	Val	Asp	Lys	Thr
385				390						395					400
Phe															

<210> 14  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 14  
 Met Thr Ala Glu Asp Ile Arg Arg Arg Asp Lys Lys Thr Glu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Leu Arg Asp Thr Trp Arg Lys Ile Gln Gly Glu Asp Asp Trp  
 20 25 30  
 Ala Gly Leu Met Asp Pro Met Asp Pro Ile Leu Arg Ser Glu Leu Ile  
 35 40 45  
 Arg Tyr Gly Glu Met Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Ala Phe Asp Phe Asp  
 50 55 60  
 Pro Ala Ser Lys Tyr Cys Gly Thr Ser Arg Phe Thr Arg Leu Glu Phe

57					85528					58									
65					70					75					80				
Phe	Asp	Ser	Leu	Gly	Met	Ile	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	Ala	Arg	Tyr				
				85					90					95					
Leu	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Leu	Pro	Asn	Phe	Phe	Ser	Lys	Ser				
			100					105					110						
Arg	Trp	Ser	Lys	Val	Trp	Ser	Lys	Asn	Ala	Asn	Trp	Met	Gly	Tyr	Val				
		115					120					125							
Ala	Val	Ser	Asp	Asp	Glu	Thr	Ser	Arg	Asn	Arg	Leu	Gly	Arg	Arg	Asp				
	130					135					140								
Ile	Ala	Ile	Ala	Trp	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala				
145					150					155					160				
Asp	Leu	Lys	Asp	Tyr	Leu	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Asn	Lys	Ile	Arg	Cys				
				165					170					175					
Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Ser	Gly	Phe	Leu	Asp	Leu	Tyr	Thr				
			180					185					190						
Asp	Lys	Asp	Thr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ala	Arg	Phe	Ser	Ala	Arg	Glu	Gln				
		195					200					205							
Ile	Leu	Thr	Glu	Val	Lys	Arg	Leu	Val	Glu	Glu	His	Gly	Asp	Asp	Asp				
	210					215					220								
Asp	Ser	Asp	Leu	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala				
225					230					235					240				
Leu	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ala	Glu	Met	Arg	Leu	Asn	Arg				
				245					250					255					
Ser	Lys	Lys	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Leu	Thr	Tyr	Gly				
			260					265					270						
Gly	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Val	Arg	Phe	Arg	Glu	Arg	Met	Glu	Glu	Leu				
		275					280					285							
Gly	Val	Lys	Val	Met	Arg	Val	Val	Asn	Val	His	Asp	Val	Val	Pro	Lys				
	290					295					300								
Ser	Pro	Gly	Leu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ser	Arg	Pro	His	Ala	Leu	Met	Lys				
305					310					315					320				
Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Pro	Trp	Cys	Tyr	Ser	His	Val	Gly	Glu	Glu	Leu				
				325					330					335					
Ala	Leu	Asp	His	Gln	Asn	Ser	Pro	Phe	Leu	Lys	Pro	Ser	Val	Asp	Val				
			340					345					350						
Ser	Thr	Ala	His	Asn	Leu	Glu	Ala	Met	Leu	His	Leu	Leu	Asp	Gly	Tyr				
		355					360						365						
His	Gly	Lys	Gly	Glu	Arg	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Gly	Arg	Asp	His	Ala				
	370					375					380								

59										85528										60										
Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Ser	Asp	Phe	Leu	Lys	Glu	His	Leu	Gln	Ile	Pro															
385					390					395					400															
Pro	Phe	Trp	Arg	Gln	Asp	Ala	Asn	Lys	Gly	Met	Val	Arg	Asn	Ser	Glu															
				405					410					415																
Gly	Arg	Trp	Ile	Gln	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Phe	Glu	Asp	His	His	Ser															
			420					425					430																	
Pro	Asp	Ile	His	His	His	Leu	Ser	Gln	Leu	Arg	Leu	Asp	His	Pro	Cys															
		435					440					445																		

<210> 15  
 <211> 1167  
 <212> ДНК  
 <213> Arabidopsis sp.

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1044)

<400> 15																				
cgg	gtc	gac	cca	cgc	gtc	cgc	gaa	aac	gct	tcc	gac	tac	gag	gtt	gta	48				
Arg	Val	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Glu	Asn	Ala	Ser	Asp	Tyr	Glu	Val	Val					
1				5					10					15						
aac ttc ctc tac gcc aca gct cgt gtt tct ctc ccc gaa ggt ttg ctt																				96
Asn	Phe	Leu	Tyr	Ala	Thr	Ala	Arg	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Gly	Leu	Leu					
			20					25					30							
ctc caa tca caa tca aga gat tct tgg gac cgt gag tct aac tgg ttt																				144
Leu	Gln	Ser	Gln	Ser	Arg	Asp	Ser	Trp	Asp	Arg	Glu	Ser	Asn	Trp	Phe					
			35				40					45								
ggc tac att gct gtc acg tct gat gaa cgg tct aag gct tta gga cgc																				192
Gly	Tyr	Ile	Ala	Val	Thr	Ser	Asp	Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg					
			50				55				60									
cgt gag atc tat ata gct ttg aga gga acg agc agg aac tat gag tgg																				240
Arg	Glu	Ile	Tyr	Ile	Ala	Leu	Arg	Gly	Thr	Ser	Arg	Asn	Tyr	Glu	Trp					
			65			70				75				80						
gtc aat gtt ttg ggt gct agg cca act tca gct gac ccc ttg ctg cac																				288
Val	Asn	Val	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Pro	Leu	Leu	His					
				85				90						95						
gga ccc gag cag gat ggt tct ggt ggt gta gtt gaa ggt acg act ttt																				336
Gly	Pro	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Thr	Thr	Phe					
			100				105					110								
gat agt gac agt gaa gat gaa gaa ggg tgt aag gtg atg ctc ggg tgg																				384
Asp	Ser	Asp	Ser	Glu	Asp	Glu	Glu	Gly	Cys	Lys	Val	Met	Leu	Gly	Trp					
			115				120					125								
ctc aca atc tat act tct aat cac ccc gaa tcg aaa ttc act aag ctg																				432
Leu	Thr	Ile	Tyr	Thr	Ser	Asn	His	Pro	Glu	Ser	Lys	Phe	Thr	Lys	Leu					

61					85528					62						
130					135					140						
agt Ser 145	cta Leu	cgg Arg	tca Ser	cag Gln	ttg Leu	tta Leu	gcc Ala	aag Lys	atc Ile	aag Lys	gag Glu	ctt Leu	ctg Leu	ttg Leu	aag Lys	480
					150						155					
tat Tyr	aag Lys	gac Asp	gag Glu	aaa Lys	ccg Pro	agc Ser	att Ile	gtg Val	ttg Leu	act Thr	gga Gly	cat His	agc Ser	ttg Leu	gga Gly	528
					165						170					
cct Pro	aca Thr	gag Glu	gct Ala	gtt Val	ctg Leu	gcc Ala	gcc Ala	tat Tyr	gat Asp	ata Ile	gct Ala	gag Glu	aac Asn	ggt Gly	tcc Ser	576
					180						185					
agt Ser	gat Asp	gat Asp	gtt Val	ccg Pro	gtc Val	act Thr	gct Ala	ata Ile	gtc Val	ttt Phe	ggt Gly	tgt Cys	cca Pro	cag Gln	gta Val	624
					195						200					
gga Gly	aac Asn	aag Lys	gag Glu	ttc Phe	aga Arg	gac Asp	gaa Glu	gta Val	atg Met	agt Ser	cac His	aag Lys	aac Asn	tta Leu	aag Lys	672
					210						215					
atc Ile	ctc Leu	cat His	gta Val	agg Arg	aac Asn	acg Thr	att Ile	gat Asp	ctc Leu	tta Leu	act Thr	cga Arg	tac Tyr	cca Pro	ggg Gly	720
					230						235					
gga Gly	ctt Leu	tta Leu	ggg Gly	tat Tyr	gtg Val	gac Asp	ata Ile	gga Gly	ata Ile	aac Asn	ttt Phe	gtg Val	atc Ile	gat Asp	aca Thr	768
					245						250					
aag Lys	aag Lys	tca Ser	ccg Pro	ttc Phe	cta Leu	agc Ser	gat Asp	tca Ser	agg Arg	aat Asn	cca Pro	ggg Gly	gat Asp	tgg Trp	cat His	816
					260						265					
aat Asn	ctt Leu	cag Gln	gcg Ala	atg Met	tta Leu	cat His	gtt Val	gta Val	gct Ala	gga Gly	tgg Trp	aat Asn	ggg Gly	aag Lys	aaa Lys	864
					275						280					
gga Gly	gag Glu	ttt Phe	aaa Lys	ctg Leu	atg Met	gtt Val	aag Lys	aga Arg	agt Ser	att Ile	gca Ala	tta Leu	gtg Val	aac Asn	aag Lys	912
					290						295					
tca Ser	tgc Cys	gag Glu	ttc Phe	ttg Leu	aaa Lys	gct Ala	gag Glu	tgt Cys	ttg Leu	gtg Val	cca Pro	gga Gly	tct Ser	tgg Trp	tgg Trp	960
					310						315					
gta Val	gag Glu	aag Lys	aac Asn	aaa Lys	gga Gly	ctg Leu	atc Ile	aag Lys	aac Asn	gaa Glu	gat Asp	ggt Gly	gaa Glu	tgg Trp	gtt Val	1008
					325						330					
ctt Leu	gct Ala	ccc Pro	gtt Val	gaa Glu	gaa Glu	gaa Glu	cct Pro	gta Val	cct Pro	gaa Glu	ttc Phe	taaattgtat				1054
					340						345					
ttctgtat tttcttaagg tcatgataaa tcaacaataa gcagttcaac tatgtgatga																1114
aaagacccaa gttattatat tgatatgagt ttatgagata aaaaaaaaaa aaa																1167

63 85528 64  
 <210> 16  
 <211> 348  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis sp.  
 <400> 16  
 Arg Val Asp Pro Arg Val Arg Glu Asn Ala Ser Asp Tyr Glu Val Val  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Tyr Ala Thr Ala Arg Val Ser Leu Pro Glu Gly Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Gln Ser Gln Ser Arg Asp Ser Trp Asp Arg Glu Ser Asn Trp Phe  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Ala Val Thr Ser Asp Glu Arg Ser Lys Ala Leu Gly Arg  
 50 55 60  
 Arg Glu Ile Tyr Ile Ala Leu Arg Gly Thr Ser Arg Asn Tyr Glu Trp  
 65 70 75 80  
 Val Asn Val Leu Gly Ala Arg Pro Thr Ser Ala Asp Pro Leu Leu His  
 85 90 95  
 Gly Pro Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Val Val Glu Gly Thr Thr Phe  
 100 105 110  
 Asp Ser Asp Ser Glu Asp Glu Glu Gly Cys Lys Val Met Leu Gly Trp  
 115 120 125  
 Leu Thr Ile Tyr Thr Ser Asn His Pro Glu Ser Lys Phe Thr Lys Leu  
 130 135 140  
 Ser Leu Arg Ser Gln Leu Leu Ala Lys Ile Lys Glu Leu Leu Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Tyr Lys Asp Glu Lys Pro Ser Ile Val Leu Thr Gly His Ser Leu Gly  
 165 170 175  
 Pro Thr Glu Ala Val Leu Ala Ala Tyr Asp Ile Ala Glu Asn Gly Ser  
 180 185 190  
 Ser Asp Asp Val Pro Val Thr Ala Ile Val Phe Gly Cys Pro Gln Val  
 195 200 205  
 Gly Asn Lys Glu Phe Arg Asp Glu Val Met Ser His Lys Asn Leu Lys  
 210 215 220  
 Ile Leu His Val Arg Asn Thr Ile Asp Leu Leu Thr Arg Tyr Pro Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Leu Gly Tyr Val Asp Ile Gly Ile Asn Phe Val Ile Asp Thr  
 245 250 255  
 Lys Lys Ser Pro Phe Leu Ser Asp Ser Arg Asn Pro Gly Asp Trp His  
 260 265 270  
 Asn Leu Gln Ala Met Leu His Val Val Ala Gly Trp Asn Gly Lys Lys



65						85528						66					
275						280						285					
Gly	Glu	Phe	Lys	Leu	Met	Val	Lys	Arg	Ser	Ile	Ala	Leu	Val	Asn	Lys		
290						295					300						
Ser	Cys	Glu	Phe	Leu	Lys	Ala	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Gly	Ser	Trp	Trp		
305					310					315					320		
Val	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Lys	Asn	Glu	Asp	Gly	Glu	Trp	Val		
				325					330					335			
Leu	Ala	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Pro	Val	Pro	Glu	Phe						
			340					345									

<210> 17  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 17

Asp	Tyr	Glu	Trp	Val	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp
1				5					10					15	
Ser	Leu	Leu	His	Pro	Lys	Ser	Leu	Gln	Lys	Gly	Ile	Asn	Asn	Lys	Asn
			20					25					30		
Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Ile	Lys	Val	Met	Asp	Gly
		35					40					45			
Trp	Leu	Lys	Ile	Tyr	Val	Ser	Ser	Asn	Pro	Lys	Ser	Ser	Phe	Thr	Arg
	50					55					60				
Leu	Ser	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Lys	Ile	Glu	Lys	Leu	Arg	Asn
65					70					75					80
Glu	Tyr	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu
				85					90					95	
Gly	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Asn	Gly
			100					105					110		
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Pro	Val	Ser	Ala	Ile	Val	Phe	Gly	Ser	Pro	Gln
		115					120					125			
Val	Gly	Asn	Lys	Ala	Phe	Asn	Glu	Arg	Ile	Lys	Lys	Phe	Ser	Asn	Leu
	130					135					140				
Asn	Ile	Leu	His	Val	Lys	Asn	Lys	Ile	Asp	Leu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Pro
145					150					155					160
Ser	Ala	Leu	Phe	Gly	Tyr	Val	Asn	Ser	Gly	Ile	Glu	Leu	Val	Ile	Asp
			165						170					175	
Ser	Arg	Lys	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Ser	Lys	Asp	Met	Gly	Asp	Trp
			180					185					190		

His Asn Leu

67

85528

68

195

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1344

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1341)

&lt;400&gt; 18

atg acg gcg gaa gat att cgc cgg cga gat aaa aaa acc gaa gaa gaa	48
Met Thr Ala Glu Asp Ile Arg Arg Arg Asp Lys Lys Thr Glu Glu Glu	
1 5 10 15	
aga aga cta aga gac acg tgg cgt aag atc caa gga gaa gac gat tgg	96
Arg Arg Leu Arg Asp Thr Trp Arg Lys Ile Gln Gly Glu Asp Asp Trp	
20 25 30	
gcc ggg tta atg gat cca atg gat cca att ctt aga tcg gag cta atc	144
Ala Gly Leu Met Asp Pro Met Asp Pro Ile Leu Arg Ser Glu Leu Ile	
35 40 45	
cgt tac ggc gaa atg gct caa gct tgt tac gac gct ttc gat ttc gat	192
Arg Tyr Gly Glu Met Ala Gln Ala Cys Tyr Asp Ala Phe Asp Phe Asp	
50 55 60	
ccc gct tcc aaa tac tgc ggc acc tcc agg ttc acg cga ctc gag ttc	240
Pro Ala Ser Lys Tyr Cys Gly Thr Ser Arg Phe Thr Arg Leu Glu Phe	
65 70 75 80	
ttc gat tct ctc gga atg atc gat tcc ggt tac gag gtg gcg cgt tac	288
Phe Asp Ser Leu Gly Met Ile Asp Ser Gly Tyr Glu Val Ala Arg Tyr	
85 90 95	
ctc tac gcg acg tcg aac atc aat ctc ccg aac ttc ttc tcg aaa tcg	336
Leu Tyr Ala Thr Ser Asn Ile Asn Leu Pro Asn Phe Phe Ser Lys Ser	
100 105 110	
cgg tgg tct aaa gtc tgg agc aaa aac gct aat tgg atg gga tac gtc	384
Arg Trp Ser Lys Val Trp Ser Lys Asn Ala Asn Trp Met Gly Tyr Val	
115 120 125	
gcc gtt tca gac gac gaa acg tct cgt aac cga ctc ggc cgc cgt gat	432
Ala Val Ser Asp Asp Glu Thr Ser Arg Asn Arg Leu Gly Arg Arg Asp	
130 135 140	
atc gcg att gcg tgg aga gga acc gtt acg aaa ctt gaa tgg atc gcg	480
Ile Ala Ile Ala Trp Arg Gly Thr Val Thr Lys Leu Glu Trp Ile Ala	
145 150 155 160	
gat cta aag gat tat tta aaa ccg gta acc gaa aac aag atc cga tgc	528
Asp Leu Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Val Thr Glu Asn Lys Ile Arg Cys	
165 170 175	
ccc gac ccg gcc gtt aaa gtc gaa tcc gga ttc tta gat ctc tac act	576

69										85528										70												
Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Ser	Gly	Phe	Leu	Asp	Leu	Tyr	Thr																	
			180					185					190																			
gac	aaa	gac	aca	acc	tgc	aaa	ttc	gcg	aga	ttc	tca	gcg	cgt	gaa	cag	624																
Asp	Lys	Asp	Thr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ala	Arg	Phe	Ser	Ala	Arg	Glu	Gln																	
			195				200					205																				
att	tta	acg	gag	gtg	aaa	cgg	tta	gtg	gaa	gaa	cac	ggc	gac	gac	gat	672																
Ile	Leu	Thr	Glu	Val	Lys	Arg	Leu	Val	Glu	Glu	His	Gly	Asp	Asp	Asp																	
			210			215						220																				
gat	tcc	gat	tta	agc	atc	acc	gtg	acg	gga	cac	agt	ctc	ggc	ggc	gcg	720																
Asp	Ser	Asp	Leu	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala																	
					230					235					240																	
tta	gcg	ata	tta	agc	gcg	tac	gat	ata	gcg	gag	atg	aga	ttg	aat	cgg	768																
Leu	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ala	Glu	Met	Arg	Leu	Asn	Arg																	
				245					250					255																		
agt	aag	aaa	ggg	aaa	gtg	att	ccg	gtg	acg	gtg	ttg	aca	tac	gga	gga	816																
Ser	Lys	Lys	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly																	
			260				265						270																			
ccg	aga	gtt	ggg	aac	gtt	agg	ttt	agg	gag	agg	atg	gag	gaa	ttg	gga	864																
Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Val	Arg	Phe	Arg	Glu	Arg	Met	Glu	Glu	Leu	Gly																	
		275					280					285																				
gtg	aaa	gtg	atg	aga	gta	gtg	aat	gtt	cac	gac	gtg	gtt	ccc	aag	tcg	912																
Val	Lys	Val	Met	Arg	Val	Val	Asn	Val	His	Asp	Val	Val	Pro	Lys	Ser																	
		290				295					300																					
ccg	gga	ttg	ttt	ttg	aac	gag	agt	aga	cct	cac	gcg	ctg	atg	aag	ata	960																
Pro	Gly	Leu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ser	Arg	Pro	His	Ala	Leu	Met	Lys	Ile																	
		305			310				315					320																		
gcg	gag	ggg	ttg	ccg	tgg	tgt	tat	agc	cac	gtg	ggg	gag	gag	ctg	gcg	1008																
Ala	Glu	Gly	Leu	Pro	Trp	Cys	Tyr	Ser	His	Val	Gly	Glu	Glu	Leu	Ala																	
				325					330					335																		
ttg	gat	cat	cag	aac	tcg	ccg	ttt	ctt	aaa	cct	tcc	gtt	gat	gtt	tct	1056																
Leu	Asp	His	Gln	Asn	Ser	Pro	Phe	Leu	Lys	Pro	Ser	Val	Asp	Val	Ser																	
			340					345					350																			
act	gct	cat	aat	ctt	gaa	gct	atg	ctt	cat	tta	ctt	gac	ggg	tat	cat	1104																
Thr	Ala	His	Asn	Leu	Glu	Ala	Met	Leu	His	Leu	Leu	Asp	Gly	Tyr	His																	
			355				360					365																				
gga	aaa	gga	gag	aga	ttt	gtg	ctg	tcg	agt	ggg	aga	gac	cat	gcg	cta	1152																
Gly	Lys	Gly	Glu	Arg	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Gly	Arg	Asp	His	Ala	Leu																	
		370				375					380																					
gtg	aac	aaa	gcg	tcg	gac	ttt	ttg	aaa	gag	cat	tta	caa	att	cca	ccg	1200																
Val	Asn	Lys	Ala	Ser	Asp	Phe	Leu	Lys	Glu	His	Leu	Gln	Ile	Pro	Pro																	
					390					395				400																		
ttt	tgg	cgt	caa	gac	gcg	aat	aaa	gga	atg	gtt	cgg	aac	agt	gaa	ggg	1248																
Phe	Trp	Arg	Gln	Asp	Ala	Asn	Lys	Gly	Met	Val	Arg	Asn	Ser	Glu	Gly																	
				405					410					415																		

71	85528	72	
cgt tgg att caa gcc gag cgt ctc	cgt ttt gag gat cat cat tct cct		1296
Arg Trp Ile Gln Ala Glu Arg Leu	Arg Phe Glu Asp His His Ser Pro		
420	425	430	
gat atc cac cac cat ctc tct cag ctc	cgt ctt gat cat cct tgt taa		1344
Asp Ile His His His Leu Ser Gln	Leu Arg Leu Asp His Pro Cys		
435	440	445	
<210> 19			
<211> 447			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 19			
Met Thr Ala Glu Asp Ile Arg Arg Arg	Asp Lys Lys Thr Glu Glu Glu		
1	5	10	15
Arg Arg Leu Arg Asp Thr Trp Arg	Lys Ile Gln Gly Glu Asp Asp Trp		
20	25	30	
Ala Gly Leu Met Asp Pro Met Asp	Pro Ile Leu Arg Ser Glu Leu Ile		
35	40	45	
Arg Tyr Gly Glu Met Ala Gln Ala	Cys Tyr Asp Ala Phe Asp Phe Asp		
50	55	60	
Pro Ala Ser Lys Tyr Cys Gly Thr	Ser Arg Phe Thr Arg Leu Glu Phe		
65	70	75	80
Phe Asp Ser Leu Gly Met Ile Asp	Ser Gly Tyr Glu Val Ala Arg Tyr		
85	90	95	
Leu Tyr Ala Thr Ser Asn Ile Asn	Leu Pro Asn Phe Phe Ser Lys Ser		
100	105	110	
Arg Trp Ser Lys Val Trp Ser Lys	Asn Ala Asn Trp Met Gly Tyr Val		
115	120	125	
Ala Val Ser Asp Asp Glu Thr Ser	Arg Asn Arg Leu Gly Arg Arg Asp		
130	135	140	
Ile Ala Ile Ala Trp Arg Gly Thr	Val Thr Lys Leu Glu Trp Ile Ala		
145	150	155	160
Asp Leu Lys Asp Tyr Leu Lys Pro	Val Thr Glu Asn Lys Ile Arg Cys		
165	170	175	
Pro Asp Pro Ala Val Lys Val Glu	Ser Gly Phe Leu Asp Leu Tyr Thr		
180	185	190	
Asp Lys Asp Thr Thr Cys Lys Phe	Ala Arg Phe Ser Ala Arg Glu Gln		
195	200	205	
Ile Leu Thr Glu Val Lys Arg Leu	Val Glu Glu His Gly Asp Asp Asp		
210	215	220	
Asp Ser Asp Leu Ser Ile Thr Val	Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala		

73	85528	74
225	230	235
240		240
Leu Ala Ile Leu Ser Ala Tyr Asp Ile Ala Glu Met Arg Leu Asn Arg		
	245	250
255		
Ser Lys Lys Gly Lys Val Ile Pro Val Thr Val Leu Thr Tyr Gly Gly		
	260	265
270		
Pro Arg Val Gly Asn Val Arg Phe Arg Glu Arg Met Glu Glu Leu Gly		
	275	280
285		
Val Lys Val Met Arg Val Val Asn Val His Asp Val Val Pro Lys Ser		
	290	295
300		
Pro Gly Leu Phe Leu Asn Glu Ser Arg Pro His Ala Leu Met Lys Ile		
	305	310
315		
Ala Glu Gly Leu Pro Trp Cys Tyr Ser His Val Gly Glu Glu Leu Ala		
	325	330
335		
Leu Asp His Gln Asn Ser Pro Phe Leu Lys Pro Ser Val Asp Val Ser		
	340	345
350		
Thr Ala His Asn Leu Glu Ala Met Leu His Leu Leu Asp Gly Tyr His		
	355	360
365		
Gly Lys Gly Glu Arg Phe Val Leu Ser Ser Gly Arg Asp His Ala Leu		
	370	375
380		
Val Asn Lys Ala Ser Asp Phe Leu Lys Glu His Leu Gln Ile Pro Pro		
	385	390
395		
Phe Trp Arg Gln Asp Ala Asn Lys Gly Met Val Arg Asn Ser Glu Gly		
	405	410
415		
Arg Trp Ile Gln Ala Glu Arg Leu Arg Phe Glu Asp His His Ser Pro		
	420	425
430		
Asp Ile His His His Leu Ser Gln Leu Arg Leu Asp His Pro Cys		
	435	440
445		

<210> 20  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності: Праймер

<400> 20  
 atgtctagag aagatattgc gcggcga

27

<210> 21  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності: Праймер

<400> 21  
 gatgagctcg acgaagctga gagagatg

28

MAAEAQPLGLSKPGPTTWPELLGSSNAWAGLLNPLNDE  
 LRELLLRGDFCQVYDTFINDQNSSYCGSSRYGKA  
 DLLHKTAFPGGADRFDVVAYLYATAKVSVPEAFLK  
 SRSREKWDRESNWIGYVVVSNDERTSRVAGRREYVV  
 WRGTTCRDYEWVDVLGAQLESAHPLLRTQQTTHVEKV  
 ENEEKKSIHKS~~SWYDCFNINLLGSASKDKGKGSDDD~~  
 DDDDPKVMQGWMTIYTSED~~PKSPFTKLSARTQLQTK~~  
 LKQLMTKYKDETLSITFAGHSLGATLSVVSAFDIVE  
 NLTTEIPVTAVVFGCPKVGNNKKFQQLFDSYPNLNVL  
 HVRNVIDLIPLYPVKLMGYVNIGIELEIDS~~RKSTFL~~  
 KDSKNPSDWHNLQAILHVVS~~GWHGVKGEFKVVNKR~~  
 VALV~~NKSC~~DFLKEECLVPPAWVVQNK~~GMLVNLKDG~~E  
 WVLAPPEEDPTPEFD

Фиг. 1

1	50
carlip	MAEAQPLGLSKPGPTTWPELLGSSNAWAGLLNPLNDELRELLLR
arlip	MKRKKKEEEEKLVITREFAKVRDLGQNHKGMLOPLDQDLREYIIHY
ipolip	MSGIAKRVKVLGSDMGEGLLEPLDSDLRRYLIHY
arlipi	MTAEDIRRRDKKTEERRLRDTARKIOGEDDWAGLMDPMDPIRSELIRY
51	100
carlip	GDFCQVYDTFINDQNSSYCGSSRYGKADLLHKTAFPGGA D..RFDVWVAY
arlip	GEMACAGYDTFNINTESQFAGSTVSRKDFFAKVGLEIAHPYTKYKVTKF
ipolip	GTMVSPATDSFINEAASKNVGLPRVARRNLLANGLVKGNPF.KYEVTKY
arlipi	GEMACACYDAFDLPASKYCGTSRFRTRLEFDSLGMIDSG...YEVARY
101	150
carlip	LYATAKVSVP.EAFLKRSRSREKWDRESNWIGYVVVSNDERTSRVA.GRRE
arlip	IYATSDIHVP.ESFLLFPISREGWSKESNMGYVAVTDDQ.GTALLGRRO
ipolip	FYAPSTIPLDEGYNVRATRADAFLKESNMNGYVAVATDE.GKVALGRRO
arlipi	LYATSNINLP..NFFSKSRWSKVMSKNANMNGYVAVSDDETSRNRLGRRO
151	200
carlip	VYVVRGTCTDYEWVDVLGAQLESAHPLLRTQQTTHVEKV ENEEKKSIHKS
arlip	IVVSRGGSVQPLEWVDFEFGLVNAI.....
ipolip	ILIVRGTIIRKSENNENLTFWFKAP.....
arlipi	IAIAVRGTVTKLEWIAADLKYLPVT.....
201	250
carlip	SSWYDCFNINLLGSASKDKGKGSDDDDDDPKVMQGWMTIYTSED <del>PKSPF</del>
arlip	.....KIFGERNDQ.VQIHQGHYSIYMSQDERSPF
ipolip	.....LFFGQNSDP.L.VHKGMIDMVTINQDSQL
arlipi	.....ENKIRCPDPAVKVESGFLLDVTOKDTTCKE
251	300
carlip	TKLSARTQLQTKLKQLMTKYKDET...LSITFAGHSLGATLSVVSADFIV
arlip	TKTNARQOVLREVGRULEKYKDEE...VSI TICGHS LGAA LATLSAIDIV
ipolip	NEKSARQOIR EEVARIVELYKDED...ISI TVTGHSLGSS MATLNAVOLA
arlipi	ARFSAREQILTEVKRLVEEHGDDDSLSITVTGHSLGGA LAILSAIDIA

Фиг.2А

77 85528 78

301 350

carlip ENLTTE.... ....IPVTAV VFGGPKVGNK KFOQLFDSYP NLNVLHVRNV  
arlip ANGYNRPKSR PDKSCPVTAF VFASPRVGDS DFRKLFSGLE DIRVLRTRNL  
ipolip ANPINN.... .NKNILVTAF LYASPKVGDE NFKNVISNQQ NLRALRISDV  
arlipi EMRLNR..SK KGKVIPTVL TYGGPRVGNV RFRERMEEL. GVKVMRVVNV

351 400

carlip IDLIPLYPVK LMG..... YVNIETET DSRKSTFLKD  
arlipi PDVPIIYPPI G..... YSEVGEFPI DTRKSPYMK  
ipolip NDIVTAVPPF GWKEGDNTAI L..... YGDVGGLVI DSKKSHYLKP  
arlipi HDVVPKSPGL FLNESRPHAL MKIAEGLPWC YSHVGEELAL DHQNSPFLKP

401 450

carlip SKNPSDWHNL QAILHVVSQW HGV.KGE.FK VVNKRVSVALV NKSCDFLKEE  
arlipi PGNLATFHCL EGYLHGVAQT QGTNKADLFR LDVERAIGLV NKSVDGLKDE  
ipolip DFPNLSTHOL MLYMHAIDGY QGSQGG..FE RQEDFDLAKV NKYGDIYKAE  
arlipi SVDVSTAHL EAMLHLLDGY HG..KGERFV LSSGRDHALV NKASDFLKEH

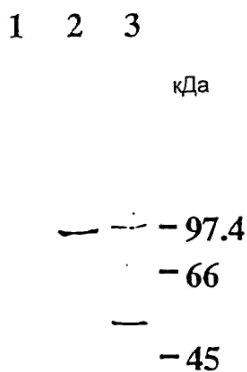
451 500

carlip CLVPPAMVWV QNKGMVLNKD GEWVLAPP.. .EEDPTPEFD .....  
arlipi CMVPGKWRVL KNKGMVQDD GSWELVDH.E IDDNEDLDF. ....  
ipolip YPIPIGWFI KDKGMVQDD GNYILDDH.E VDKTF.....  
arlipi LQIPPFWRQD ANKGMVRNSE GRWIAERLR FEDHHSPDIH HHLSQLRLDH

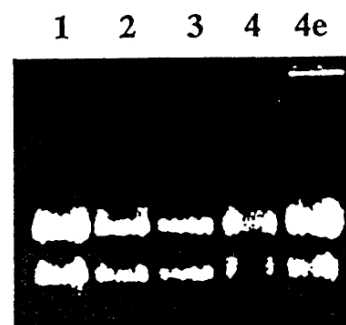
501

carlip ..  
arlipi ..  
ipolip  
arlipi PC

Фиг. 2Б



Фиг. 3



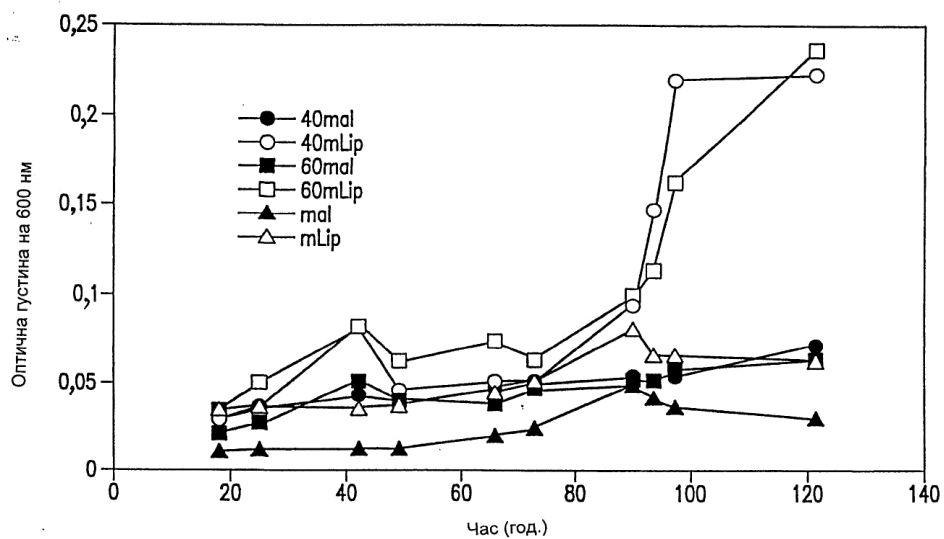
Фиг. 4А

1 2 3 4 4e Т.п.н.

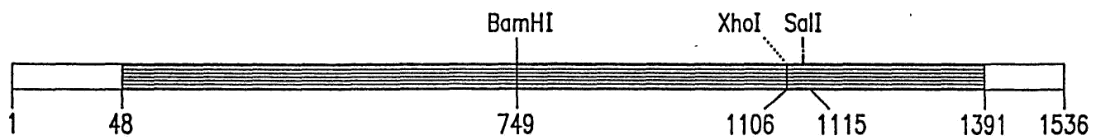


Фіг. 4Б

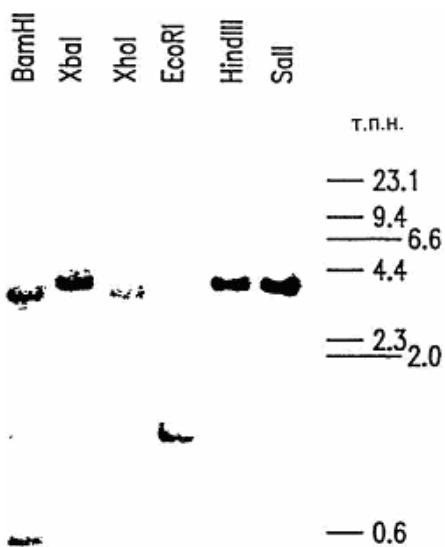
In vivo ліполітична ацилгідролазна активність



Фіг. 5



ФІГ. 6А



Фіг.6Б



GCACGAGCCATTCCAAAACCTCCTTACACCACTCAAACTATTCCAACATGGCTGCAGAAGCCCAACCTTTAGGCCTCTC  
 AAAGCCCGGCCAACATGGCCGAACCTCTCGGGTCCAACGCTTGGGCCGGGCTACTAAACCCGCTCAACGATGAGCTC  
 CGTGAGCTCCTCTACGCTGCGGGGACTTCTGCCAGGTGACATACGACACCTTCATAAACGACCAGAACTCGTCCTACT  
 GCGGCAGCAGCCGCTACGGGAAGGCGGACCTACTTCATAAGACCGCCTTCCCGGGGGCGCAGACCGGTTTGACGTGGT  
 GGCCTACTTGTACGCCACTGCGAAGGTCAGCGTCCCAgAGGCGTTTCTGCTGAAGTCGAGGTCGAGGGAGAAGTGGGAT  
 AGGGAATCGAATTGGATTGGGTATGTCGTGGTGTGCAATGACGAGACGAGTCGGGTGGCGGGACGAAGGGAGGTGTATG  
 TGGTGTGGAGAGGGACTTGTAgGGATTATGAGTGGGTTGATGTTCTTGGTGTCAACTTGAGTCTGCTCATCCTTTGTT  
 ACGCACTCAACAACTACTCATGTTGAAAAGGTGAAAAATGAGGAAAAGAAGAGCATTCAAAATCAAGTTGGTACGAC  
 TGTTTTCAATATCAACCTACTAgGTTCCGCGTCCAAAGACAAAGGAAAAGGAAGCGACGACGACGATGATGACGACCCCA  
 AAGTGATGCAAGTTGGATGACAATATACACATCGGAGGATCCCAATCACCTTCACAAAATAAGTGCAAGAACACA  
 ACTTCAGACCAAACTCAACAATAATGACAAAATACAAAGACGAAACCTAAGCATAACATTGCGCGGTACAGCCTA  
 GCGCGACACTATCAGTCGTGAGCGCCTTCGACATAGTGGAGAATCTCACGACGAGATCCAGTCACGGCCGTGGTCT  
 TCGGGTGCCCAAAAGTAGGCAACAAAAATTCACAACCTCTTCGACTCGTACCCAACTAAATGTCTCCATGTAAG  
 GAATGTCATCGACCTGATCCCTCTGTATCCCGTGAACTCATGGGTACGTGAACATAGGAATCGAGCTGGAGATCGAC  
 TCGAGGAAGTCGACCTTTCTAAAGGACTCGAAAAACCCGAGTGATTGGCATAATTTGCAAGCAATATTGCATGTTGTAA  
 GTGGTTGGCATGGGGTTAAGGGGGAGTTTAAGGTTGTAATAAGAGAAGTGTTCATTGGTTAATAAGTCATGTGATTT  
 TCTTAAGGAAGAATGTTTGGTTCTCCAGCTTGGTGGGTGTGTCAGAACAAAGGGATGGTTTTGAATAAGGATGGTGAG  
 TGGGTTTTGGCTCCTCCTGAGGAAGATCCTACTCCTGAATTTGATTGATAATATTTATCATGTTTTATATTTTATAA  
 ATTTTACTAAATTTACATGACAAATTTATGGGACTAAGTTACTTATTTATATGTTTATTATATTTGAAATGTGTTTAAAG  
 TTACATAAAATTCGAATTAGTTTTAAAAAAAAAAAA

некодуєча ділянка клону кДНК

Фіг. 7

Met	Ala	Ala	Glu	Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Leu	Ser	Lys	Pro	Gly	Pro	Thr	Trp	Pro	Glu	Leu
1				5					10					15					20
Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Trp	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Asn	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu	Leu
21				25					30					35					40
Leu	Leu	Arg	Cys	Gly	Asp	Phe	Cys	Gln	Val	Thr	Tyr	Asp	Thr	Phe	Ile	Asn	Asp	Gln	Asn
41				45					50					55					60
Ser	Ser	Tyr	Cys	Gly	Ser	Ser	Arg	Tyr	Gly	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	His	Lys	Thr	Ala	Phe
61				65					70					75					80
Pro	Gly	Gly	Ala	Asp	Arg	Phe	Asp	Val	Val	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Thr	Ala	Lys	Val	Ser
81				85					90					95					100
Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Ser	Arg	Ser	Arg	Glu	Lys	Trp	Asp	Arg	Glu	Ser	Asn
101				105					110					115					120
Trp	Ile	Gly	Tyr	Val	Val	Val	Ser	Asn	Asp	Glu	Thr	Ser	Arg	Val	Ala	Gly	Arg	Arg	Glu
121				125					130					135					140
Val	Tyr	Val	Val	Trp	Arg	Gly	Thr	Cys	Arg	Asp	Tyr	Glu	Trp	Val	Asp	Val	Leu	Gly	Ala
141				145					150					155					160
Gln	Leu	Glu	Ser	Ala	His	Pro	Leu	Leu	Arg	Thr	Gln	Gln	Thr	Thr	His	Val	Glu	Lys	Val
161				165					170					175					180
Glu	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Ile	His	Lys	Ser	Ser	Trp	Tyr	Asp	Cys	Phe	Asn	Ile	Asn
181				185					190					195					200
Leu	Leu	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys	Asp	Lys	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
201				205					210					215					220

83										85528										84																					
Pro	Lys	Val	Met	Gln	Gly	Trp	Met	Thr	Ile	Tyr	Thr	Ser	Glu	Asp	Pro	Lys	Ser	Pro	Phe	221		225							230						235						240
Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Arg	Thr	Gln	Leu	Gln	Thr	Lys	Leu	Lys	Gln	Leu	Met	Thr	Lys	Tyr	241		245							250						255						260
Lys	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Phe	Ala	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	261		265							270						275						280
Val	Ser	Ala	Phe	Asp	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Val	281		285							290						295						300
Phe	Gly	Cys	Pro	Lys	Val	Gly	Asn	Lys	Lys	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Asp	Ser	Tyr	Pro	Asn	301		305							310						315						320
Leu	Asn	Val	Leu	His	Val	Arg	Asn	Val	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Leu	Tyr	Pro	Val	Lys	Leu	321		325							330						335						340
Met	Gly	Tyr	Val	Asn	Ile	Gly	Ile	Glu	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Arg	Lys	Ser	Thr	Phe	Leu	341		345							350						355						360
Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Pro	Ser	Asp	Trp	His	Asn	Leu	Gln	Ala	Ile	Leu	His	Val	Val	Ser	361		365							370						375						380
Gly	Trp	His	Gly	Val	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Val	Asn	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Val	381		385							390						395						400
Asn	Lys	Ser	Cys	Asp	Phe	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Pro	Ala	Trp	Trp	Val	Val	401		405							410						415						420
Gln	Asn	Lys	Gly	Met	Val	Leu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Glu	Glu	421		425							430						435						440
Asp	Pro	Thr	Pro	Glu	Phe	Asp														441		445																			

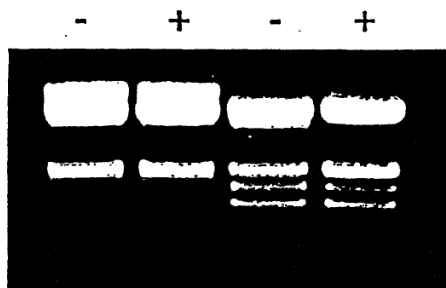
ФІГ. 8Б

Квітка стадії II

Змішане листя

(молоде та старе)

Обробка етиленом



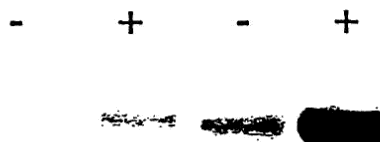
Фіг. 9А

Квітка стадії II

Змішане листя

(молоде та старе)

Обробка етиленом



Фіг. 9Б

(приклад PCR-1)

CTCTAGACTATGAGTGGGTGGATGTTTTAGGTGCTCGTCCTGATTGAGCTGACTCTCTTCTTCATCCTAAATCTCTCCAA  
D Y E W V D V L G A R P D S A D S L L H P K S L Q

AAAGGCATTAACAACAAGACGATGAGGATGAGGACGAGGACGAGGATGAGATCAAAGTAATGGATGGGTGGCTTAAGAT  
K G I N N K N D E D E D E D E D E I K V M D G W L K I

CTACGTCTCAAGTAACCCGAAGTCGTCTTTACGAGACTAAGTGCAAGAGAACAACCTCAAGCAAAGATTGAAAAGTTAA  
Y V S S N P K S S F T R L S A R E Q L Q A K I E K L R

GAAATGAGTATAAAGATGAGAATTTGAGCATAACTTTACAGGGCATAGTCTTGGTGCTAGCTTAGCTGTTTTAGCTTCA  
N E Y K D E N L S **I T F T G H S L G A** S L A V L A S

TTTGATGTGGTTGAAAATGGTGTGCCAGTTGATATTCAGTATCTGCAATTGTATTTGGTAGTCCACAAGTTGGGAATAA  
F D V V E N G V P V D I P V S A I V F G S P Q V G N K

GGCATTCAATGAAAGAATCAAGAAATCTCAAACCTGAATATCTTACATGTTAAGAACAAGATTGATCTCATTACCTTT  
A F N E R I K K F S N L N I L H V K N K I D L I T L Y

ACCCAAGTGCTCTGTTTGGGTATGTGAATTCAGgtattgaaggaaagatcattacaattttgagctagattttctcatat  
P S A L F G Y V N S G

cgtcacactcaactaacagttattatatgagaaagtcacttttcttgtgaaaaattgaatcaacttttggaataaatag

tagttgagtgaccatatgagaaatcaacactctactaactttatgctataagagaataggttaagggtccatatgtttata

ctgtctgttcaattagaatcataaaagtattactagttaaatttgactacaatcttatgtagacatgaataaaataaatc

ctacataaataagatttctacaactttaatgatttctcaacagGTATAGAGCTAGTCATCGATAGCAGAAAGTCTCCGA  
I E L V I D S R K S P S

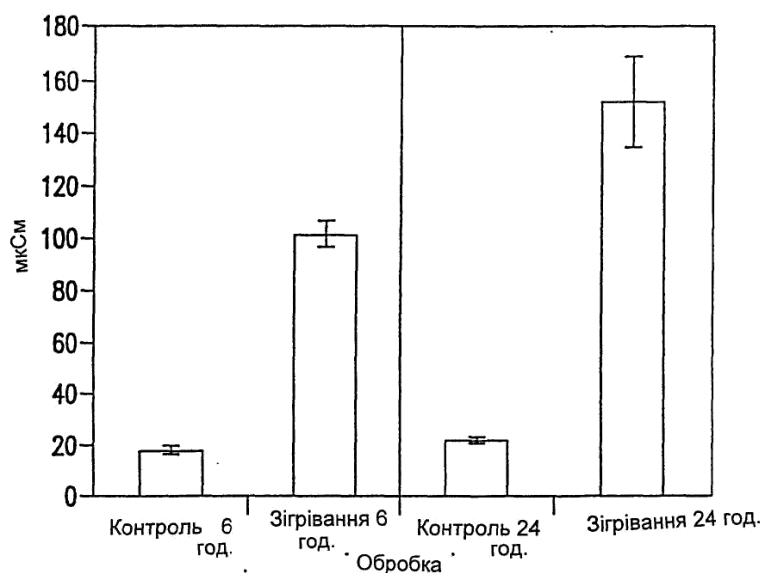
(приклад PCR-3)

GTTTAAAGGATTCAAAGACATGGGCGACTGGCACAACCTCCA

L K D S K D M G D W H N L

Фиг. 10

Дія заморозку протягом 48 год при 8 °C на цілі рослини



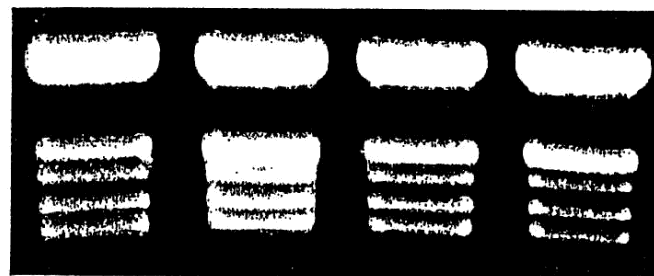
Фиг. 11

87 85528 88

Зріле листя Перед заморозком

Заморожок 48 год, час зігрівання  
0 год. 6 год. 24 год.

РНК



PCR-  
фрагмент  
ліпази томата



Фіг. 12

```

1/1          31/11          61/21
CGG GTC GAC CCA CGC GTC CGC GAA AAC GCT TCC GAC TAC GAg GTT GTA AAC TTC CTC TAC GCC ACA GCT CGT GTT TCT CTC CCC GAA GGT
R V D P R V R E N A S D Y E V V N F L Y A T A R V S L P E G
91/31        121/41
TTG CTT CTC CAA TCA CAA TCA AGA gAT TCT TGG GAC CGT GAG TCT AAC TGG TTT GGC TAC ATT GCT GTC ACG TCT GAT GAA CGG TCT AAG
L L L Q S Q S R D S W D R E S N W F G Y I A V T S D E R S K
181/61       211/71
GCT TTA GGA CGC CGT GAG ATC TAT ATA GCT TTG AGA GGA ACG AGC AGG AAC TAT GAG TGG GTC AAT GTT TTG GGT GCT AGG CCA ACT TCA
A L G R R E I Y I A L R G T S R N Y E W V N V L G A R P T S
271/91       301/101
GCT GAC CCC TTG CTG CAC GGA CCC GAG CAG GAT GGT TCT GGT GGT GTA GTT GAA GGT ACG ACT TTT GAT AGT GAC AGT GAA GAT GAA GAA
A D P L L H G P E Q D G S G G V V E G T T F D S D S E D E E
361/121      391/131
GGG TGT AAG GTG ATG CTC GGG TGG CTC ACA ATC TAT ACT TCT AAT CAC CCC GAA TCG AAA TTC ACT AAG CTG AGT CTA CGG TCA CAG TTG
G C K V M L G W L T I Y T S N H P E S K F T K L S L R S Q L
451/151      481/161
TTA GCC AAG ATC AAG GAG CTT CTG TTG AAG TAT AAG GAC GAG AAA CCG AGC ATT GTG TTG ACT GGA CAT AGC TTG GGA CCT ACA GAG GCT
L A K I K E L L L K Y K D E K P S I V L T G H S L G A T E A
541/181      571/191
GTT CTG GCC GCC TAT GAT ATA GCT GAG AAC GGT TCC AGT GAT GAT GTT CCG GTC ACT GCT ATA GTC TTT GGT TGT CCA CAG GTA GGA AAC
V L A A Y D I A E N G S S D D V P V T A I V F G C P Q V G N
631/211      661/221
AAG GAG TTC AGA GAC GAA GTA ATG AGT CAC AAG AAC TTA AAG ATC CTC CAT GTA AGG AAC ACG ATT GAT CTC TTA ACT CGA TAC CCA GGG
K E F R D E V M S H K N L K I L H V R N T I D L L T R Y P G

```

ФІГ. 13A

721/241 751/251 781/261  
 GGA CTT TTA GGG TAT GTG GAC ATA GGA ATA AAC TTT GTG ATC GAT ACA AAG AAG TCA CCG TTC CTA AGC GAT TCA AGG AAT CCA GGG GAT  
 G L L G Y V D I G I N F V I D T K K S P F L S D S R N P G D  
 811/271 841/281 871/291  
 TGG CAT AAT cTT CAG GCG ATG TTA CAT GTT GTA GCT GGA TGG AAT GGG AAG AAA GGA GAG TTT AAA CTG ATG GTT AAG AGA AGT ATT GCA  
 W H N L Q A M L H V V A G W N G K K G E F K L M V K R S I A  
 901/301 931/311 961/321  
 TTA GTG AAC AAG TCA TGC GAG TTc TTG AAA GCT GAG TGT TTG GTG CCA GGA TCT TGG TGG GTA GAG AAG AAC AAA GGA CTG ATC AAG AAC  
 L V N K S C E F L K A E C L V P G S W W V E K N K G L I K N  
 991/331 1021/341 1051  
 GAA GAT GGT GAA TGG GTT cTT GCT CCC GTT GAA GAA GAA CCT GTA CCT GAA TTC TAA ATT GTA TTT CTG TAT TTT TCT CTA AGG TCA TGA  
 E D G E W V L A P V E E E P V P E F \*  
 1081 1111 1141 1165  
 TAA ATC AAC AAT AAG CAG TTC AAC TAT GTG ATG AAA AGA CCC AAG TTA TTA TAT TGA TAT GAG TTT ATG AGA TAA AAA AAA AAA AAA

Примітка: Ідентичність нуклеотидів, позначених маленькими літерами, потребує підтвердження.

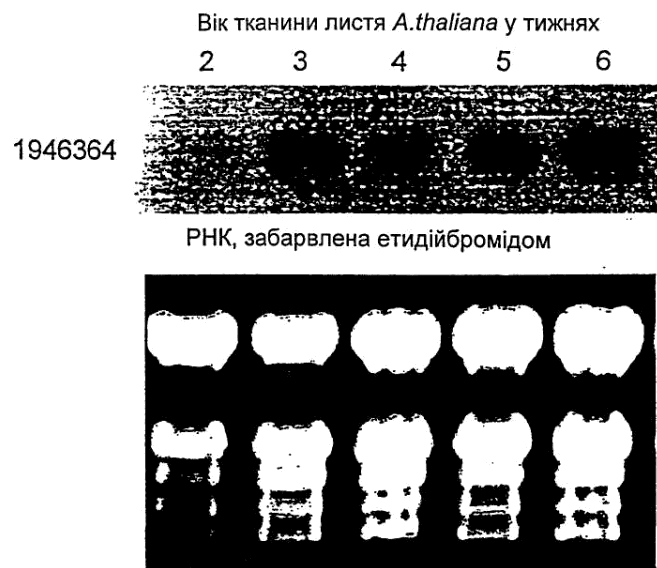
Фір.13Б

Послідовність ліпази старіння *Arabidopsis thaliana*

ATGACGGCGGAAGATATTCGCCGGCGAGATAAAAAACCGAAGAAGAAAGAACTAAGAG  
 M T A E D I R R R D K K T E E E R R L R  
 ACACGTGGCGTAAGATCCAAGGAGAAGACGATTGGCCGGTTAATGGATCCAATGGATCCA  
 D T W R K I Q G E D D W A G L M D P M D P  
 ATTCTTAGATCGGAGCTAATCCGTTACGGCGAAATGGCTCAAGCTTGTACGACGCTTTTCGAT  
 I L R S E L I R Y G E M A Q A C Y D A F D  
 TTCGATCCCGCTTCCAAATACTCGGCACCTCCAGGTTACGCGGACTCGAGTTCTTCGATTCTC  
 F D P A S K Y C G T S R F T R L E F F D S  
 TCGGAATGATCGATTCCCGGTTACGAGGTGGCGCGTTACCTCTACGCGACGTCGAACATCAATC  
 L G M I D S G Y E V A R Y L Y A T S N I N  
 TCCGAACTTCTTCTCGAAATCGCGGTGGTCTAAAGTCTGGAGCAAAAACGCTAATTGGATGG  
 L P N F F S K S R W S K V W S K N A N W M  
 GATACGTCGCGGTTTCAGACGACGAAACGCTCTCGTAACCGACTCGGCCGCGGTGATATCGCGA  
 G Y V A V S D D E T S R N R L G R R D I A  
 TTGCGTGGAGGAACCGTTACGAACTTGAATGGATCGCGGATCTAAAGGATTATTTAAAA  
 I A W R G T V T K L E W I A D L K D Y L K  
 CCGGTAACCGAAACAAGATCCGATGCCCGACCCGCGGTTAAAGTGAATCCGATTCTTA  
 P V T E N K I R C P D P A V K V E S G F L  
 GATCTCTACACTGACAAAGACAACTGCAAAATTCGCGAGATTCTCAGCGCGTGAACAGATT  
 D L Y T D K D T T C K F A R F S A R E Q I  
 TTAACGGAGGTGAAACGGTTAGTGAAGAACACGGCGACGACGATGATTCCGATTAAAGCAT  
 L T E V K R L V E E H G D D D D S D L S  
 CACCGTGACGGGACACAGTCTCGCGCGCGGTTAGCGATATTAAGCGGTACGATATAGCGG  
 A L A I L S A Y D I A  
 AGATGAGATTGAATCGGAGTAAGAAAGGAAAGTATTCCGGTGACGGTGTGACATACGGA  
 E M R L N R S K K G K V I P V T V L T Y G  
 GGACCGAGAGTTGGGAACGTTAGGTTTAGGGAGAGGATGGAGGAATTGGGAGTAAAGTGAT  
 G P R V G N V R F R E R M E E L G V K V M  
 GAGAGTAGTGAATGTTACGACGTTGGTTCCCAAGTCGCCGGGATTGTTTTGAACGAGAGTAG  
 R V V N V H D V V P K S P G L F L N E S R  
 ACCTCACGCGTGATGAAGATAGCGGAGGGGTTGCCGTGTTATAGCCACGTGGGGGAGG  
 P H A L M K I A E G L P W C Y S H V G E  
 AGCTGGCGTTGGATCATCAGAACTCGCCGTTTCTTAAACCTTCGTTGATGTTTCTACTGCTCA  
 E L A L D H Q N S P F L K P S V D V S T A I  
 TAATCTTGAAGCTATGCTTCACTTACTTGACGGGTATCATGAAAAGGAGAGAGATTGTGCT  
 N L E A M L H L L D G Y H G K G E R F V L  
 GTCGAGTGGGAGAGACCATGCGCTAGTGAACAAAGCGTCGGACTTTTGAAGAGCATTAC  
 S S G R D H A L V N K A S D F L K E H L  
 AAATCCACCGTTTTGGCGTCAAGACGCGAATAAAGGAATGGTTCGGAACAGTGAAGGTGCT  
 Q I P P F W R Q D A N K G M V R N S E G R  
 TGGATTCAAGCCGAGCGTCTCGTTTTGAGGATCATCTCTCTGATATCCACCACCATCTCT  
 W I Q A E R L R F E D H H S P D I H H H L  
 CTCAGCTCCGTCTTGATCATCTTGTTAA  
 S Q L R L D H P C

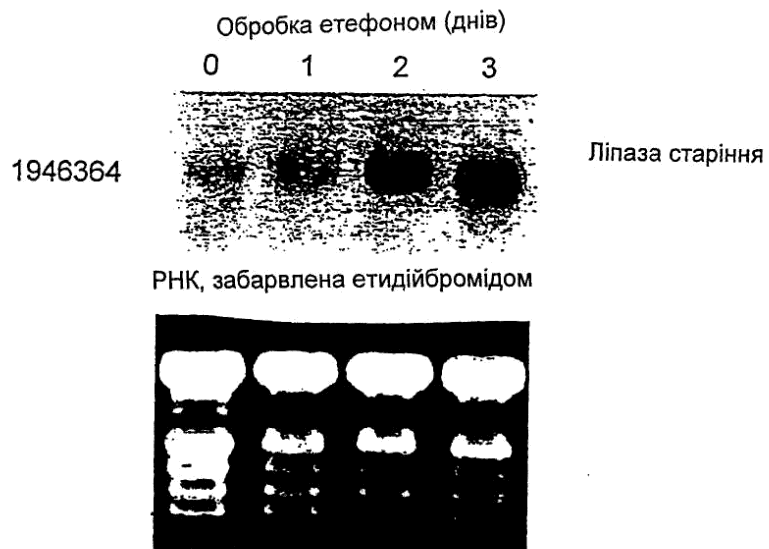
Фір. 14

Нозерн-блот старіючої тканини листа *Arabidopsis thaliana*



Фіг.15

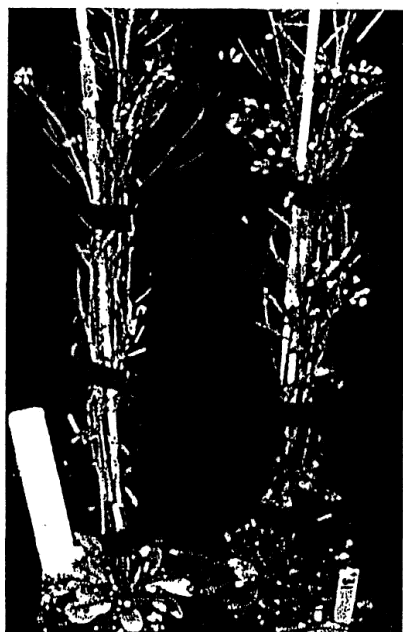
Нозерн-блот тканини листа *Arabidopsis thaliana*,  
обробленого етефоном



Фіг.16



6,3 тижня



31

Д.т.



Д.т.

34

35

Fig. 18

7 тижнів

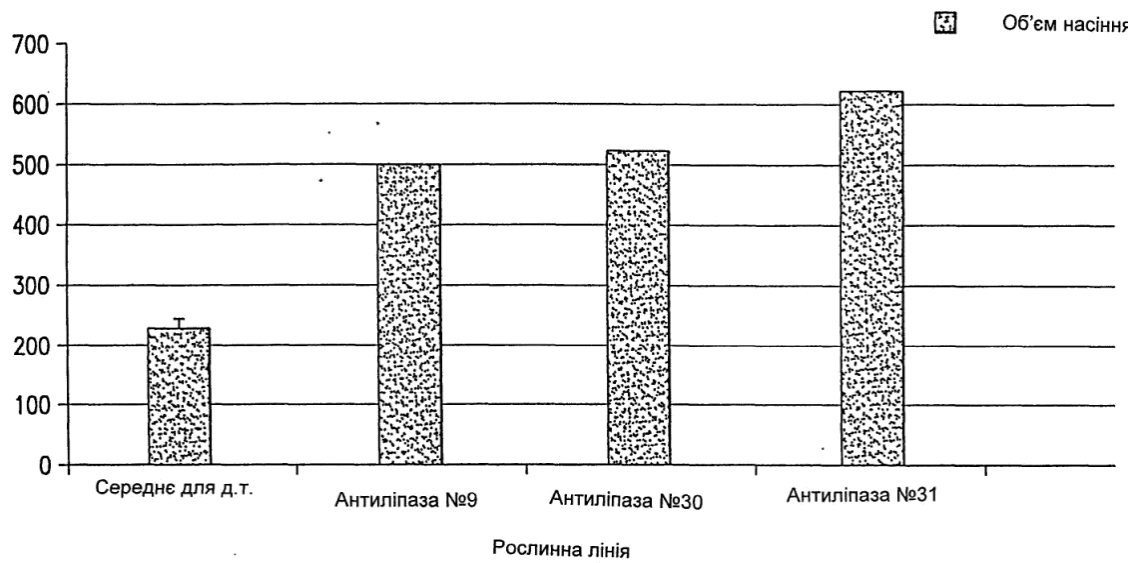


Дикий тип

 $\alpha$ -Ліпаза №9

Фіг. 19

Об'єм насіння трансгенних рослин з антисмисловою ліпазою



Фіг. 20



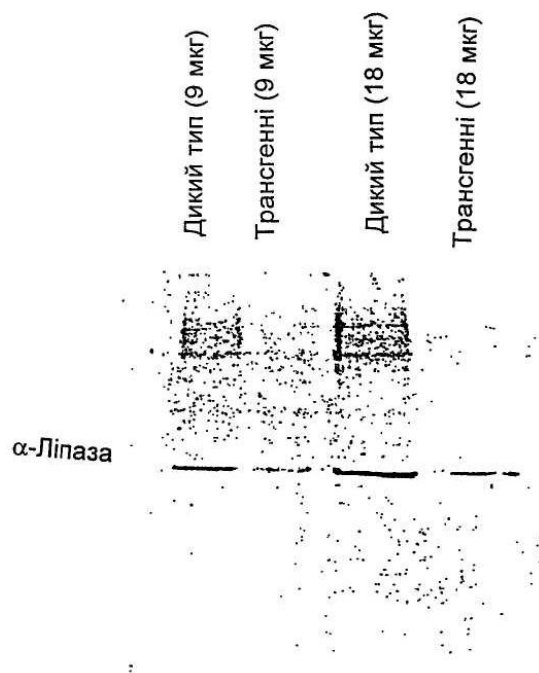


Fig.21