



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 84669

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 9/14

C12N 15/29

C12N 15/55

C12N 15/82

A01H 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ТЕПЛОСТАБІЛЬНІ МУТАНТИ ФЕРМЕНТІВ БІОСИНТЕЗУ КРОХМАЛЮ

1

2

(21) 2003098455

(22) 14.03.2002

(24) 25.11.2008

(86) PCT/US02/07768, 14.03.2002

(31) 60/275,768

(32) 14.03.2001

(33) US

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ХАННАН КЕРТІС Л., ГРІН ТОМАС У., БЕР-
ДЖЕР БРАЯН(73) ЮНІВЕРСИТІ ОФ ФЛОРІДА РІСЕРЧ ФАУН-
ДЕЙШН, ІНК.

(56) WO9958698, 18.11.1999

WO0164928, 07.09.2001

US5650557, 22.06.1997

US6069300, 30.05.2000

US5589618, 31.12.1996

(57) 1. Полінуклеотид, що кодує мутантну велику субодиницю поліпептиду рослинної ендоспермної АДФ-глюкозопірофосфорилази або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного поліпептиду, причому згаданий мутантний поліпептид включає амінокислотні мутації у двох або більше сайтах амінокислотної послідовності згаданого поліпептиду, та такий, що, коли згаданий мутантний поліпептид експресується з малою субодиницею АДФ-глюкозопірофосфорилази з утворенням мутантного ферменту АДФ-глюкозопірофосфорилази, то згаданий мутантний фермент або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного ферменту демонструє підвищену теплостабільність і/або підвищену ферментну активність у порівнянні з ферментом АДФ-глюкозопірофосфорилази дикого типу, де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає першу амінокислотну мутацію, де гістидин в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 333 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту, і де

згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає другу амінокислотну мутацію, де аланін в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 177 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту.

2. Полінуклеотид за п.1, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, вибрана з групи, яка складається з тирозину, фенілаланіну, метіоніну, гліцину, серину, треоніну, цистеїну, аспарагіну та глутаміну.

3. Полінуклеотид за п.1, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою тирозин.

4. Полінуклеотид за п.1, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою фенілаланін.

5. Полінуклеотид за п.1, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою метіонін.

6. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 1-5, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою пролін.

7. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 1-5, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою валін.

8. Полінуклеотид, що кодує мутантну велику субодиницю поліпептиду рослинної ендоспермної АДФ-глюкозопірофосфорилази або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного поліпептиду, причому згаданий мутантний поліпептид включає амінокислотні мутації у двох або більше сайтах амінокислотної послідовності згаданого поліпептиду, та такий, що, коли згаданий мутантний поліпептид експресується з малою субодиницею АДФ-глюкозопірофосфорилази з утворенням мутантного ферменту АДФ-глюкозопірофосфорилази, то згаданий мутантний фермент або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного ферменту демонструє підвищену

(13) C2

(11) 84669

(19) UA

теплостабільність і/або підвищену ферментну активність у порівнянні з ферментом АДФ-глюкозопірофосфорилази дикого типу, де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає першу амінокислотну мутацію, де аланін в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 177 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту, і де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає другу амінокислотну мутацію, де аланін в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 396 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту.

9. Полінуклеотид за п.8, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою пролін.

10. Полінуклеотид за п.8, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою валін.

11. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 8-10, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 396, являє собою валін.

12. Полінуклеотид, що кодує мутантну велику субодиницю поліпептиду рослинної ендоспермної АДФ-глюкозопірофосфорилази або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного поліпептиду, причому згаданий мутантний поліпептид включає амінокислотні мутації у двох або більше сайтах амінокислотної послідовності згаданого поліпептиду, та такий, що, коли згаданий мутантний поліпептид експресується з малою субодиницею АДФ-глюкозопірофосфорилази з утворенням мутантного ферменту АДФ-глюкозопірофосфорилази, то згаданий мутантний фермент або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного ферменту демонструє підвищену теплостабільність і/або підвищену ферментну активність у порівнянні з ферментом АДФ-глюкозопірофосфорилази дикого типу, де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає першу амінокислотну мутацію, де гістидин в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 333 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту, і де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає другу амінокислотну мутацію, де аланін в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 396 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту.

13. Полінуклеотид за п.12, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, вибрана з групи,

яка складається з тирозину, фенілаланіну, метіоніну, гліцину, серину, треоніну, цистеїну, аспарагіну та глутаміну.

14. Полінуклеотид за п.12, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою тирозин.

15. Полінуклеотид за п.12, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою фенілаланін.

16. Полінуклеотид за п.12, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою метіонін.

17. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 12-16, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 396, являє собою валін.

18. Полінуклеотид, що кодує мутантну велику субодиницю поліпептиду рослинної ендоспермної АДФ-глюкозопірофосфорилази або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного поліпептиду, причому згаданий мутантний поліпептид включає амінокислотні мутації у двох або більше сайтах амінокислотної послідовності згаданого поліпептиду, та такий, що, коли згаданий мутантний поліпептид експресується з малою субодиницею АДФ-глюкозопірофосфорилази з утворенням мутантного ферменту АДФ-глюкозопірофосфорилази, то згаданий мутантний фермент або біологічно активний фрагмент згаданого мутантного ферменту демонструє підвищену теплостабільність і/або підвищену ферментну активність у порівнянні з ферментом АДФ-глюкозопірофосфорилази дикого типу, де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає першу амінокислотну мутацію, де гістидин в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 333 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту, і де згаданий мутантний поліпептид, що кодується згаданим полінуклеотидом, включає третю амінокислотну мутацію, де аланін в згаданому поліпептиді, що знаходиться у положенні 396 амінокислотної послідовності великої субодиниці дикого типу АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи, замінений амінокислотою, що забезпечує згадане збільшення теплостабільності і/або підвищення ферментної активності згаданого мутантного ферменту.

19. Полінуклеотид за п.18, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, вибрана з групи, яка складається з тирозину, фенілаланіну, метіоніну, гліцину, серину, треоніну, цистеїну, аспарагіну та глутаміну.

20. Полінуклеотид за п.18, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою тирозин.
21. Полінуклеотид за п.18, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою фенілаланін.
22. Полінуклеотид за п.18, де амінокислота, що замінює гістидин у положенні 333, являє собою метіонін.
23. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 18-22, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою пролін.
24. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 18-22, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 177, являє собою валін.
25. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 18-22, де амінокислота, що замінює аланін у положенні 396, являє собою валін.
26. Полінуклеотид за будь-яким з попередніх пунктів, де згаданий мутантний білок також включає амінокислотну мутацію, що забезпечує підвищену вагу насіння у рослини, що експресує згаданий полінуклеотид.
27. Полінуклеотид за п.26, де згаданий полінуклеотид включає мутацію Rev6.
28. Полінуклеотид за п.26 або п.27, де згаданий полінуклеотид кодує велику субодиницю ферменту AGP, в якому принаймні один залишок серину вбудований між амінокислотами, що відповідають номерам 494 та 495 амінокислотної послідовності поліпептиду дикого типу великої субодиниці АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи нативної субодиниці ферменту AGP.
29. Полінуклеотид за п.28, де згаданий полінуклеотид кодує велику субодиницю ферменту AGP, в якому принаймні одна пара амінокислот тирозин:серин вбудована між амінокислотами, що відповідають номерам 494 та 495 амінокислотної послідовності поліпептиду дикого типу великої субодиниці АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи нативної субодиниці ферменту AGP.
30. Полінуклеотид за п.26 або п.27, де згаданий полінуклеотид кодує велику субодиницю ферменту AGP, в якому принаймні одна пара амінокислот серин:тирозин вбудована між амінокислотами, що відповідають номерам 495 та 496 амінокислотної послідовності поліпептиду дикого типу великої субодиниці АДФ-глюкозопірофосфорилази кукурудзи нативної субодиниці ферменту AGP.
31. Полінуклеотид за будь-яким з пунктів 1-30, де згаданою рослиною є злак.
32. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є рис.
33. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є пшениця.
34. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є ячмінь.
35. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є овес.
36. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є сорго.
37. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є кукурудза.
38. Полінуклеотид за п.31, де згаданим злаком є просо.

39. Спосіб підвищення резистентності рослини до умов теплового стресу, де спосіб включає вбудовування полінуклеотиду згідно з будь-яким з попередніх пунктів у згадану рослину та експресію білка, що кодується згаданим полінуклеотидом.
40. Спосіб за п.39, в якому вказана рослина являє собою однодольну рослину.
41. Спосіб за п.40, в якому вказана однодольна рослина вибрана з групи, яка складається з рису, пшениці, ячменю, вівса, сорго, кукурудзи, лілії і проса.
42. Спосіб за п.39, в якому вказана рослина являє собою *Zea mays*.
43. Спосіб за п.39, в якому вказана рослина являє собою дводольну рослину.
44. Спосіб за п.43, в якому вказана дводольна рослина вибрана з групи, яка складається з гороху, люцерни, турецького гороху, цикорію, конюшини, кормової капусти, сочевиці, трави для газонів, сої, тютюну, картоплі, топінамбура, редиски, качанної капусти, рапсу, яблуні і салату-латука.
45. Спосіб підвищення ферментної активності АДФ-глюкозопірофосфорилази рослини, де спосіб включає вбудовування полінуклеотиду згідно з будь-яким з пунктів 1-38 у згадану рослину та експресію білка, що кодується згаданим полінуклеотидом.
46. Спосіб за п.45, в якому вказана рослина являє собою однодольну рослину.
47. Спосіб за п.46, в якому вказана однодольна рослина вибрана з групи, яка складається з рису, пшениці, ячменю, вівса, сорго, кукурудзи, лілії і проса.
48. Спосіб за п.45, в якому вказана рослина являє собою *Zea mays*.
49. Спосіб за п.45, в якому вказана рослина являє собою дводольну рослину.
50. Спосіб за п.49, в якому вказана дводольна рослина вибрана з групи, яка складається з гороху, люцерни, турецького гороху, цикорію, конюшини, кормової капусти, сочевиці, трави для газонів, сої, тютюну, картоплі, топінамбура, редиски, качанної капусти, рапсу, яблуні і салату-латука.
51. Рослинна клітина, що включає полінуклеотид за будь-яким з пунктів 1-38.
52. Рослинна клітина за п.51, де згадана рослинна клітина є клітиною однодольної рослини.
53. Рослинна клітина за п.52, причому згадана клітина однодольної рослини вибрана з групи, яка складається з клітин рису, пшениці, ячменю, вівса, сорго, кукурудзи, лілії і проса.
54. Рослинна клітина за п.51, де згадана рослинна клітина є клітиною *Zea mays*.
55. Рослинна клітина за п.51, де згадана рослинна клітина є клітиною дводольної рослини.
56. Рослинна клітина за п.55, де згадану клітину дводольної рослини вибрано з групи, яка складається з клітин гороху, люцерни, турецького гороху, цикорію, конюшини, кормової капусти, сочевиці, трави для газонів, сої, тютюну, картоплі, топінамбура, редиски, качанної капусти, рапсу, яблуні, салату-латука.
57. Мутант великої субодиниці поліпептиду рослинної ендоспермної АДФ-глюкозопірофосфорилази або біологічно активного

фрагменту згаданого поліпептиду, що кодується полінуклеотидом згідно з будь-яким з пунктів 1-38.
 58. АДФ-глюкозопірофосфорилаза рослини, що включає мутант великої субодиниці за п.57.
 59. Рослина або рослинна тканина, що включає або трансформована полінуклеотидом згідно з будь-яким з пунктів 1-38.
 60. Рослина або рослинна тканина за п.59, де згадана рослина або рослинна тканина є однодольною.
 61. Рослина або рослинна тканина за п.60, де згадана однодольна рослина або рослинна тканина вибрана з групи, яка складається з рису, пшениці, ячменю, вівса, сорго, кукурудзи, лілії і проса.

Даний винахід було зроблено за підтримки уряду в межах гранту державного наукового фонду під номером 9316887.

Пункти формули даної заявки базуються на пріоритеті попередньої заявки США, що має порядковий номер 60/275,768 та подана 14 березня 2001 року.

Природа життя рослин, що характеризується нездатністю до пересування, породжує постійний вплив факторів навколишнього середовища, що спричинює позитивні та негативні впливи на їх ріст та розвиток. Одна з основних перешкод, з якими зіштовхується сільське господарство, полягає у шкідливому впливі умов навколишнього середовища. Одним з важливих факторів, які спричинюють значні втрати врожаю, є тепловий стрес. Температурний стрес у значній мірі зменшує врожай багатьох зернових культур, таких, як кукурудза, пшениця та ячмінь. Втрати врожаю з причини теплового стресу коливаються в межах від 7 до 35% для важливих злакових культур, що поширені в усьому світі.

За допомогою ряду досліджень було ідентифіковано можливі фізіологічні наслідки теплового стресу. Ранні роботи Hunter та ін. (Hunter, R.B., Tollenaar, M. та Breuer, C.M. [1977] *Can.J.Plant Sci.* 57:1127-1133) при використанні умов ростових камер показали, що температура зменшує тривалість періоду виповнення зерна у кукурудзи. Подібні результати, в яких тривалість періоду виповнення зерна була несприятливим чином змінена при впливі підвищених температур, були ідентифіковані Tollenaar та Bruulsema (Tollenaar, M. та Bruulsema, T.W. [1988] *Can.J.Plant Sci.* 68: 935-940). Badu-Apraku та ін. (Badu-Apraku, B., Hunter, R.B. та Tollenaar, M. [1983] *Can.J.Plant Sci.* 63: 357-363) визначали значне зменшення врожаю кукурудзи при температурному режимі день/ніч - 35/15°C у порівнянні з тими, що вирощувалися при температурному режимі 25/15°C. Знижений з причини підвищених температур врожай також підтверджується як історичними, так і кліматологічними дослідженнями (Thompson, L.M. [1986] *Agron.J.* 78: 649-653; Thompson, L.M. [1975] *Science* 188: 535-541; Chang, J. [1981] *Agricul.Metero.* 24: 253-262; та Conroy, J.P., Seneweera, S., Basra, A.S., Rogers, G., та Nissen-Wooler, B. [1994] *Aust.J.Plant Physiol.* 21: 741-758).

62. Рослина або рослинна тканина за п.59, де згадана рослина або рослинна тканина являє собою *Zea mays*.

63. Рослина або рослинна тканина за п.59, де згадана рослина або рослинна тканина є дводольною.

64. Рослина або рослинна тканина за п.63, де згадана дводольна рослина або рослинна тканина вибрана з групи, яка складається з гороху, люцерни, турецького гороху, цикорію, конюшини, кормової капусти, сочевиці, трави для газонів, сої, тютюну, картоплі, топінамбура, редиски, качанної капусти, рапсу, яблуні, салату-латука.

Той факт, що фізіологічні процеси розвитку насіння піддаються шкідливому впливові теплового стресу, є очевидним з досліджень, що використовують систему *in vitro* культури зародків (Jones, R.J., Gengenbach, B.G., та Cardwell, V.B. [1981] *Crop Science* 24: 761-766; Jones, R.J., Ouattar, S., та Crookston, P.K. [1984] *Crop Science* 24: 133-137; та Cheikh, N. та Jones, R.J. [1995] *Physiol.Plant.* 95: 59-66). Зародки кукурудзи, які культивують при температурі 35°C, яка є вищою за оптимальну, демонструють значне зменшення ваги.

Робота з пшеницею дала змогу ідентифікувати втрату активності розчинної синтази крохмалю (SSS) як ознаку відповіді ендосперму пшениці на тепловий стрес (Hawker, J.S. та Jenner, C.F. [1993] *Aust.J.Plant Physiol.* 20: 197-209; Denyer, K., Hylton, C.M., та Smith A.M. [1994] *Aust.J.Plant Physiol.* 21: 783-789; Jenner, C.F. [1994] *Aust.J.Plant Physiol.* 21: 791-806). Додаткові дослідження з SSS ендосперму пшениці показали, що вона є теплолабільною (Reijven, A.H.G.C. [1986] *Plant Physiol.* 81: 448-453; Keeling, P.L., Bacon, P.J., Holt, D.C. [1993] *Planta* 191: 342-348; Jenner, C.F., Denyer, K., та Guerin, J. [1995] *Aust.J.Plant Physiol.* 22: 703-709).

Роль SSS та АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази (AGP) в умовах теплового стресу у кукурудзи є менш зрозумілою. AGP каталізує перетворення АТФ та α-глюкозо-1-фосфату в АДФ-глюкозу та пірофосфат. АДФ-глюкоза використовується як донор глікозиду при біосинтезі крохмалю рослинами та у біосинтезі глікогену у бактерій. Важливість АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази як ключового ферменту у регуляції біосинтезу крохмалю було відзначено у дослідженні мутантів кукурудзи (*Zea Mays*), що мають дефіцит крохмалю в ендоспермі (Tsai, C.Y., та Nelson, Jr., O.E. [1966] *Science* 151: 341-343; Dickinson, D.B., J. Preiss [1969] *Plant Physiol.* 44:1058-1062).

Ou-Lee та Setter (Ou-Lee, T. та Setter, T.L. [1985] *Plant Physiol.* 79: 852-855) перевіряли впливи температури на апікальні або верхівкові ділянки качанів кукурудзи. При підвищених температурах активність AGP більш низькою в апікальних зернинах при порівнянні з базальними зернинами під час інтенсивного запасання крохмалю. На противагу цьому, у зернинах, що розвивалися при нормальних температурах, активність AGP була одна-

ковою в апікальних та базальних зернинах під час цього періоду. Проте активність синтази крохмалю під час цього періоду диференційно не зачіпалась в апікальних та базальних зернинах. Крім того, апікальні зернини, які піддавали тепловій обробці, демонстрували підвищення активності синтази крохмалю понад контролем. Цього не спостерігали для активності AGP. Singletary та ін. (Singletary, G.W., Banisadr, R., та Keeling, P.L. [1993] *Plant Physiol.* 102: 6 (додатк.); Singletary, G.W., Banisadr, R., Keeling, P.L. [1994] *Aust.J.Plant Physiol.* 21: 829-841) при використанні системи культури *in vitro* кількісно оцінювали вплив різних температур під час періоду виповнення зерна. Вага насіння незмінно зменшувалася при підвищенні температури від 22 до 36°C. Значення AGP у втрахат врожаю також підтримується роботою Duke та Doeblert (Duke, E.R. та Doeblert, D.C. [1996] *Environ. Exp. Botany.* 36:199-208).

Робота Keeling та ін. (1994, вище) кількісно оцінює активність SSS у кукурудзі та пшениці при використанні аналізу Q₁₀ та показує, що SSS є важливою контрольною точкою у потоці вуглецю у крохмаль.

Біохімічні дослідження *in vitro* з AGP та SSS ясно свідчать, що обидва ферменти є теплолабільними. AGP ендосперму кукурудзи на 96% втрачає свою активність при прогріванні при 57°C протягом 5 хвилин (Hannah, L.C., Tuschall, D.M. та Mans, R.J. [1980] *Genetics* 95: 961-970). Це знаходиться у протиріччі з AGP картоплі, яка є повністю стабільною при температурі 70°C (Sowokinos, J.R. та Preiss, J. [1982] *Plant Physiol.* 69: 1459-1466; Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, J., та Preiss, J. [1990] *Plant Physiol.* 93: 785-90). Дослідження з теплової інактивації SSS показали, що вона також є лабільною при високих температурах, а кінетичні дослідження визначили, що значення K_m для амілопектину зростає експоненціально, якщо температура підвищується від 25 до 45°C (Jenner та ін., 1995, вище).

Біохімічні та генетичні дослідження ідентифікували AGP як ключовий фермент у біосинтезі крохмалю у вищих рослинах та у синтезі глікогену в *E.coli* (Preiss, J. та Romeo, T. [1994] *Progress in Nuc.Acid Res. And Mol Biol.* 47: 299-329; Preiss, J. та Sivak, M. [1996] "Starch synthesis in sinks and sources", In "Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. Zamski, E., ред. Marcil Dekker Inc. pp. 139-168). AGP каталізує те, що розглядається як початковий етап на шляху біосинтезу крохмалю, при цьому продукт реакції є активованим донором глюкози, АДФ глюкозою. Вона використовується синтазою крохмалю для подовження полісахаридного полімера (розглядається у Hannah, L. Curtis [1996] "Starch synthesis in the maize endosperm", In: "Advances in cellular and Molecular Biology of Plants, VoU.B.A. Larkins та I.K.Vasil (ред.) Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).

Попереднє дослідження AGP картоплі показали, що експресія в *E.coli* дає фермент з алостеричними та кінетичними властивостями, що дуже

подібні до ферменту, виділеного з непошкоджених бульб (Iglesias, A., Barry, G.F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P., Greene, T., Laughlin, M.J., Okita, T.W., Kishore, G.M., та Preiss, J. [1993] *J.Biol Chem.* 268: 1081-86; Ballicora, M.A., Laughlin, M.J., Fu, Y., Okita, T.W., Barry, G.F. та Preiss, J. [1995] *Plant Physiol.* 109: 245-251). Green та ін. (Greene, T.W., Chantler, S.E., Kahn, M.L., Barry, G.F., Preiss, J., та Okita, T.W. [1996] *Proc.Natl.Acad.Sci.* 93: 1509-1513; Greene, T.W., Woodbury, R.L., та Okita, T.W. [1996] *Plant Physiol.* (112: 1315-1320) показали корисність систем бактеріальної експресії в своїх структурно-функціональних дослідженнях з AGP картоплі. Були ідентифіковані множинні мутації, важливі у картуванні алостеричних сайтів та сайтів зв'язування субстрату (Okita, T.W., Greene, T.W. Laughlin, M.J., Salamone, P., Woodbury, R., Choi, S., Ito, H., Kavakli, H., та Stephens, K. [1996] *J "Engineering Crops for Industrial End Uses, Shewry, P.R., Napier, J.A., та Davis, P., ред. Portland Press Ltd., London).*

Ферменти AGP були ізолювані як з бактерій, так і з рослин. Бактеріальна AGP представляє собою гомотетрамер, у той час, як рослинна AGP з фотосинтетичних та нефотосинтетичних тканин є гетеротетрамером, що складається з двох різних субодиниць. Рослинний фермент кодується двома різними генами, причому одна субодиниця є більшою за іншу. Ця ознака спостерігається у ряді рослин. Субодиниці AGP листя шпинату мають молекулярну вагу 54 кДа та 51 кДа, як було визначено за допомогою SDS-поліакриламідного гелю. Обидві субодиниці є імунореактивними з антитілом проти очищеної AGP з листя шпинату (Copeland, L., J.Preiss (1981) *Plant Physiol.* 68: 996-1001; Morell, M., M. Bloon, V. Knowles, J. Preiss [1988] *J.Bio.Chem.* 263: 633). Імунологічний аналіз при використанні антисироватки, приготовленої проти великої та малої субодиниць листя шпинату, показав, що AGP бульб картоплі також кодується двома генами (Okita та ін., 1990, вище). Також були ізолювані та секвеновані клони кДНК двох субодиниць бульб картоплі (масою 50 та 51 кДа) (Muller-Rober, B.T., J. Kossmann, L.C.Hannah, L. Willmitzer, U. Sounewald [1990] *Mol.Gen.Genet.* 224: 136-146; Nakata, P.A., T.W. Greene, J.M. Anderson, B.J. Smith-White, T.W.Okita, J.Preiss [1991] *Plant Mol.Biol.* 17: 1089-1093). Велика субодиниця AGP бульб картоплі є теплостабільною (Nakata та ін. [1991], вище).

Як було постульовано Hannah та Nelson (Hannah, L.C., O.E. Nelson (1975) *Plant Physiol.* 55: 297-302; Hannah, L.C. та Nelson, Jr., O.E. [1976] *Biochem. Genet.* 14:547-560), обидва гени Shrunken-2 (Sh2) (Bhave, M.R., S.Lawrence, C.Barton, L.C.Hannah [1990] *Plant Cell* 2: 581-588) та Brittle-2 (Bt2) (Bae, J.M., M.Giroux, L.C.Hannah [1990] *Maydica* 35: 317-322) є структурними генами АДФ глюкозо-1-фосфат-аденілілтрансферази ендосперму кукурудзи. Sh2 та Bt2 кодують велику субодиницю та маленьку субодиницю ферменту, відповідно. З результатів секвенування кДНК було передбачено молекулярну вагу білків Sh2 та Bt2, яка складає 57,179 Да (Shaw, J.R., L.C.Hannah [1992] *Plant Physiol.* 98: 1214-1216) та 52,224 Да,

відповідно. Ендосперм представляє собою сайт основного відкладання крохмалю під час розвитку зернин у кукурудзі. Sh2 та bt2 мутанти ендосперму кукурудзи мають значно знижені рівні крохмалю, що відповідають недостатнім рівням активності AGP. Мутації у будь-якому гені були показані як такі, що зменшують активність AGP приблизно на 95% (Tsai та Nelson, 1966, вище; Dickinson та Preiss, 1969, вище). Крім того, спостерігали, що ферментативні активності збільшуються згідно з кількістю функціональних алелів Sh2 та Bt дикого типу, у той час, як мутантні ферменти мають змінені кінетичні властивості. AGP представляє собою складову, що лімітує швидкість у процесі біосинтезу крохмалю у рослин. Stark та ін. поміщали мутантну форму AGP *E.coli* у бульби картоплі та одержували 35%-не збільшення вмісту крохмалю (Stark та ін. [1992] *Science* 258:287).

Клонування та характеристика генів, які кодує субодиниці ферменту AGP, були проведені для різних рослин. Такі приклади включають кДНК Sh2 (Bhave та ін., 1990, вище), геномну ДНК Sh2 (Shaw та Hannah, 1992, вище) та кДНК Bt2 (Bae та ін., 1990, вище) з кукурудзи; кДНК маленької субодиниці (Anderson, J.M., J.Hnilo, R.Larson, T.W. Okita, M. Morell, J. Preiss [1989] *J. Biol. Chem.* 264: 12238-12242) та геномну ДНК (Anderson, J.M., R.Larson, D.Landencia, W.T.Kim, D.Morrow, T.W.Okita, J.Preiss [1991] *Gene* 97: 199-205), що виділена з рису; а також кДНК маленької та великої субодиниць з листя шпінату (Morell та ін., 1988, вище) та бульб картоплі (Muller-Rober та ін., 1990, вище; Nakata, P.A., Green, T.W., Anderson, J.W., Smith-White, B.J., Okita, T.W., та Preiss, J. [1991] *Plant Mol.Biol.* 17: 1089-1093). Крім того, були ізольовані клони кДНК з ендосперму пшениці та тканини листя (Olive, M.R., R.J. Ellis, W.W.Schuch [1989] *Plant Physiol.Mol.Biol.* 12: 525-538), а також з листя *Arabidopsis thaliana* (Lin, T., Caspar, T., Sommerville, C.R., та Preiss, J. [1988] *Plant Physiol.* 88: 1175-1181). Послідовності AGP ячменя були також описані в Ainsworth та ін. (Ainsworth.C, Hosein, F., Tarvis, M., Weir, F., Burrell, M., Devos, K.M., Gale, M.D. [1995] *Planta*).

AGP функціонує як алостеричний фермент в усіх тканинах та організмах, досліджених на сьогоднішній день. Вперше було показано, що алостеричні властивості AGP є важливими в *E.coli*. Був ізольований мутант *E.coli*, що понадекспресує глікоген, та була картована мутація для структурного гена AGP, що був позначений як *glyC*. Мутант *E.coli*, відомий як *glyC-16* був показаний як такий, що є більш чутливим до активатора, фруктозо-1,6-біфосфату, та менш чутливим до інгібітора, cAMP (Preiss, J. [1984] *Ann. Rev. Microbiol.* 419-458). Незважаючи на те, що рослинні усі AGP є алостеричними, вони реагують з іншими ефекторними молекулами, ніж бактеріальні AGP. У рослинах 3-фосфогліцерина кислота (3-PGA) функціонує як активатор, у той час фосфат (PO₄) служить інгібітором (Dickinson та Preiss, 1969, вище).

Використовуючи систему мутагенезу *in vivo*, створену за допомогою Ас-опосередкованого надлишку Ds елемента, здатного до переміщення, випадково розміщеного поблизу відомого сайту

активатора зв'язування, Giroux та ін. (Giroux, M.J., Barry, G., Cobb, G.B., Green, T., Okita, T.W. та Hannah, L.C. [1996] *Proc.Natl. Acad. Sci.* 93: 5824-5829) одержали змогу отримати сайт-специфічні мутанти у функціонально важливій ділянці AGP ендосперму кукурудзи. Один мутант, Rev6, що містить тирозин-серинову вставку у великій субодиниці AGP обумовлює 11-18%-не збільшення ваги насіння. Крім того, опублікована міжнародна заявка WO 01/64928 показує, що різноманітні характеристики, такі, як кількість насіння, рослинна біомаса, індекс врожаю, тощо, можуть бути підвищені у рослинах, трансформованих за допомогою полінуклеотиду, що кодує велику субодиницю AGP кукурудзи, яка містить Rev6 мутацію.

Опубліковані міжнародні патентні (заявки WO 99/58698 та WO 98/22601), а також виданий (патент США №6,069,300) розкривають мутації у великій субодиниці ферменту AGP кукурудзи, що при експресії забезпечують підвищення теплостабільності у порівнянні з такими, що спостерігаються для дикого типу ферменту AGP. Деякі теплостабільні мутанти розкриті у більше, ніж 300 патентах та публікаціях WO, включаючи мутанти, що позначені, як HS13 (мають заміну Ala на Pro у положенні 177); HS14 (що має заміну Asp на His у положенні 400 та Val на He у положенні 454); HS16 (що має заміну Arg на Thr у положенні 104); HS33 (що має заміну His на Tyr у положенні 333); HS39 (що має заміну His на Tyr у положенні 333 та заміну Thr на He у положенні 460); HS47 (що має заміну Arg на Pro у положенні 216 та заміну His на Tyr у положенні 333); RTS48-2 (що має заміну Ala на Val у положенні 177) та RTS60-1 (що має заміну Ala на Val у положенні 396).

Об'єкт даного винаходу відноситься до матеріалів та способів, що є корисними для підвищення врожайів рослин, зокрема, зернових культур. В одному втіленні предмет винаходу забезпечує теплостабільні ферменти AGP та нуклеотидні послідовності, що кодує ці ферменти. У бажаному втіленні теплостабільні мутанти за винаходом можуть використовуватися для одержання рослин, які мають вищу толерантність до підвищених температур, що таким чином підвищує врожай цих рослин. В особливо бажаному втіленні поліпшені рослини представляють собою зернові культури. Зернові культури, до яких застосовується даний винахід, включають, наприклад, кукурудзу, пшеницю, рис, ячмінь.

Фіг.1 показує геномну нуклеотидну послідовність алеля Shrunken-2 дикого типу *Zea mays*. Інтрони позначені літерами знизу. Основа 1 представляє собою сайт початку транскрипції.

Фіг.2 показує порівняння ферментативної активності для дикого типу та різноманітних мутантів великої субодиниці AGP кукурудзи. Усі реакції проводили у повторності. Наведені числа є середнім значенням повторності після віднімання значення фону. Процент відноситься до активності, що залишається після теплової обробки у порівнянні з активністю перед тепловою обробкою. Підписи для фігури є наступними: "sh2"= sh2 білок дикого типу;

"sh2hf = білок sh2 дикого типу після теплової обробки;

"33" = білок sh2, що містить мутацію HS33 (тобто амінокислотну заміну гістидин-на-тирозин у положенні 333 у великій субодиниці AGP кукурудзи);

"33hf = білок sh2, що містить мутацію після теплової обробки; "177" = білок sh2, що містить мутацію rts48-2 (тобто амінокислотну заміну аланін-на-валін у положенні 177 у великій субодиниці AGP кукурудзи);

"177hf = білок sh2, що містить мутацію rts48-2 (тобто амінокислотну заміну аланін-на-валін у положенні 177 у великій субодиниці AGP кукурудзи), після теплової обробки;

"396" = білок sh2, що містить мутацію rts60-1 (тобто амінокислотну заміну аланін-на-валін у положенні 396 у великій субодиниці AGP кукурудзи);

"396hf = білок sh2, що містить мутацію rts60-1 (тобто амінокислотну заміну аланін-на-валін у положенні 396 у великій субодиниці AGP кукурудзи), після теплової обробки; "7+6" = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "177" та "396";

"7+6hf = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "177" та "396", після теплової обробки;

"7+3" = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "177" та "HS33";

"7+3hf = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "177" та "HS33", після теплової обробки;

"6+3" = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "396" та "HS33";

"6+3hf = білок sh2, що містить комбінацію мутацій "396" та "HS33", після теплової обробки.

Фіг.3 показує рестрикційну карту кодуєчої ділянки Sh2. Показані рестрикційні ферменти є такими, що використовуються при ізоляції цілої кодуєчої ділянки та при створенні подвійних або потрійних мутантів. Мутації позначені за допомогою зірочки (*).

SEQ ID NO.1 представляє собою амінокислотну послідовність ділянки, що відповідає амінокислотам від 318 до 350 великої субодиниці AGP кукурудзи, що містить мутацію HS33.

SEQ ID NO.2 представляє собою амінокислотну послідовність ділянки, що відповідає амінокислотам від 170 до 189 великої субодиниці AGP кукурудзи, що містить мутацію RTS48-2.

SEQ ID NO.3 представляє собою амінокислотну послідовність ділянки, що відповідає амінокислотам від 389 до 406 великої субодиниці AGP кукурудзи, що містить мутацію RTS60-1.

SEQ ID NO.4 представляє собою геномну нуклеотидну послідовність алеля дикого типу Shrunken-2 Zea mays.

SEQ ID NO.5 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

SEQ ID NO.6 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

SEQ ID NO.7 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

SEQ ID NO.8 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

SEQ ID NO.9 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

SEQ ID NO.10 представляє собою синтетичний олігонуклеотидний праймер, що може використовуватися у відповідності з об'єктом винаходу.

Об'єкт даного винаходу відноситься до нових мутантних молекул поліпептидів та до поліпептидів, що кодуються ними, які забезпечують підвищену теплорезистентність та врожай рослин, що вирощуються в умовах теплового стресу, у порівнянні з рослинами, що експресують генотип дикого типу. У специфічних втіленнях поліпептидні молекули об'єкта винаходу кодують ферментативні активності АДФ глюкозо-1-фосфатаденілілтрансферази ендосперму кукурудзи (AGP) та розчинної синтази крохмалю (SSS). Мутантні ферменти забезпечують підвищену стабільність до умов теплового стресу під час розвитку насіння та рослин у рослинних та насінних тканинах, що експресують ферменти, у порівнянні з ферментативними активностями дикого типу.

Один аспект об'єкту даного винаходу відноситься до поліпептидів, які кодують дві або більше амінокислотні заміни у великій субодиниці AGP, у порівнянні з послідовністю дикого типу поліпептиду великої субодиниці AGP, при цьому мутантний білок, що експресується, демонструє підвищену стабільність. Бажано, коли поліпептид, що кодується поліпептидами за даним винаходом, при експресії з малою субодиницею демонструє підвищену ферментативну активність у порівнянні з білком дикого типу та переважно на рівні, який є приблизно таким самим або більшим від такого, що демонструється при мутації однієї амінокислоти, яка забезпечує підвищену теплову стабільність, такою, як, наприклад, HS33. Поліпептиди за даним винаходом можуть кодувати дві, три або більше амінокислотних змін послідовності дикого типу. Бажано, коли поліпептиди за даним винаходом кодують поліпептид, який має амінокислотну заміну в одному або більше наступних положеннях, що відповідають положенням великої субодиниці AGP кукурудзи: положеннях 177, 333 та 396.

В одному втіленні поліпептид за даним винаходом кодує мутантну велику субодиницю рослинної AGP, що має подвійну мутацію: амінокислотну заміну гістидину на тирозин та амінокислотну заміну аланіну на валін у послідовності поліпептиду. У наведеному в прикладах втіленні заміна гістидину на тирозин відбувається у положенні амінокислоти, що відповідає номеру залишка 333 у послідовності великої субодиниці AGP кукурудзи. В одному втіленні заміна аланіну на валін відбувається у положенні амінокислоти, що відповідає номеру залишка 177 в послідовності великої субодиниці AGP кукурудзи. В іншому втіленні заміна аланіну на валін відбувається у положенні амінокислоти, що відповідає номеру залишка 396 в послідовності великої субодиниці AGP кукурудзи.

В подальшому втіленні полінуклеотид за даним винаходом кодує мутантну велику субодиницю рослини AGP, що містить дві амінокислотні заміни аланіну на валін у послідовності поліпептиду. У втіленні, що представлене у прикладах, перша заміна аланіну на валін відбувається по амінокислоті, що відповідає залишку в положенні 177, а друга заміна аланіну на валін відбувається по амінокислоті, що відповідає залишку під номером 396 у послідовності великої субодиниці AGP кукурудзи. Ферментативна активність, асоційована з мутантними білками за даним винаходом, які мають дві мутації, представлена на Фіг.2.

Інше втілення пов'язане з потрійним мутантом, що включає заміну гістидину на тирозин по амінокислоті, що відповідає залишку під номером 333, заміну аланіну на валін по амінокислоті, що відповідає залишку під номером 177, та заміну аланіну на валін по амінокислоті, що відповідає залишку 396 у послідовності великої субодиниці AGP кукурудзи.

Номери амінокислотних залишків, що згадані вище, базуються на загальноприйнятих номерах амінокислот у цьому білку (Shaw та Hannah, 1992, вище). Положення цих замінь можуть бути легко ідентифіковані середнім спеціалістом у даній галузі. Таблиця 1 нижче показує подвійні та потрійні амінокислотні заміни мутантів, приклади яких представлені у даній заявці.

Таблиця 1

Sh2 мутант поліпептиду	Амінокислотна заміна
HS 7+3	Ala на Val у положенні 177 та His на Tyr у положенні 333
HS6+3	Ala на Val у положенні 396 та His на Tyr у положенні 333
HS 7+6	Ala на Val у положенні 177 та Ala на Val у положенні 396
HS 7+6+3	Ala на Val у положенні 177 та Ala на Val у положенні 396 та His на Tyr у положенні 333

З причини існування гомології між поліпептидами AGP у різних видів рослин (Smith-White та Preiss [1992] J.Mol.Evol. 34: 449-464), середній спеціаліст у даній галузі може легко визначити положення мутацій в AGP рослин, відмінних від кукурудзи, що відповідає положенню мутацій в AGP кукурудзи, які розкриті у даній заявці. Таким чином, даний винахід охоплює полінуклеотиди, що кодує мутантну AGP рослин, відмінних від кукурудзи, включаючи, але не обмежуючись, пшеницю, ячмінь, овес, рис, які забезпечують підвищену теплостабільність при експресії в рослині.

Мутації, які пов'язані з заміною однієї амінокислоти в AGP, що забезпечує теплостабільність, та способи одержання та селекції таких мутацій розкриті у Патенті США № 6,069,300 та опублікованих міжнародних заявках WO 99/58698 та WO 98/22601. Типово, плазмиду, що включає полінуклеотид, який кодує SH2 субодиницю AGP кукурудзи, піддавали мутагенезу, вводили в мутантні клітини *E.coli* glgC, що експресують BT2 субодини-

цю, клітини вирощували при температурі 42°C та піддавали селекції на мутанти, що можуть продукувати глікоген при цій температурі. Були ізольовані декілька мутантів, що називалися теплостабільними мутантами (HS). Готували сирові екстракти цих мутантів та визначали теплостабільність одержаної AGP. Мутанти, що містять одну амінокислотну заміну, зберігали 8-59% своєї активності після інкубації при 60°C протягом 5 хвилин. Крім того, загальна ферментативна активність мутантних AGP ендосперму кукурудзи перед тепловою обробкою підвищувалася приблизно у 2-3 рази у декількох мутантів.

Множинна теплостабільність, що притаманна мутаціям, може бути легко поєднана усередині однієї субодиниці. Наприклад, можуть використовуватися різноманітні унікальні рестрикційні сайти, що поділяють кодуючі ділянки Sh2 на три різні фрагменти. Якщо це є прийнятним, комбінації мутацій можуть бути генеровані шляхом субклонування відповідного фрагменту, що містить додаткову мутацію. Якщо дві мутації знаходяться у безпосередній близькості, то для створення таких комбінацій може використовуватися сайт-направлений мутагенез. Один спосіб сайт-специфічного мутагенезу використовує ПЛР, мутагенний праймер та рестрикційну ендонуклеазу DpnI. Праймери можуть бути сконструйовані так, щоб містити мутацію на 5'-кінці, та можуть використовуватися для ПЛР ампліфікації при застосуванні полімерази корегування Vent. Ампліфікована ДНК може бути потім перетравлена за допомогою DpnI. Батьківську ДНК, ізольовану з *E.coli*, піддають метилуванню, і таким чином, вона стає чутливою до DpnI. Перетравлену ДНК піддають фракціонуванню за розмірами шляхом гель-електрофорезу, лігують та клонують в експресійні вектори. Мутації підтверджують аналізом секвенування та трансформують в штам AC70R1-504, що несе маленьку субодиницю дикого типу. Потім можуть аналізуватися комбінаторні мутанти.

Об'єкт винаходу також відноситься до мутантних поліпептидів, які кодує полінуклеотидами за даним винаходом та мають амінокислотні заміни, описані у даній заявці. У бажаному втіленні мутантні поліпептиди мають походження з кукурудзи.

Об'єкт винаходу також стосується теплостабільних мутантів AGP за даним винаходом, поєднаних з теплостабільними мутаціями у маленькій субодиниці ферменту. Мутації у маленькій субодиниці AGP, що надають ферменту теплостабільності, також можуть бути легко приготовлені та ідентифіковані при використанні способів, [описаних у Патенті США №6,069,300 та в опублікованих міжнародних заявках WO 99/58698 та WO 98/22601]. Теплостабільні мутанти маленької субодиниці можуть бути коекспресовані з мутантами за даним винаходом для подальшого поліпшення ферменту AGP.

Рослини та вторинні рослинні тканини, що містять мутантні полінуклеотиди або трансформовані за допомогою мутантних полінуклеотидів за даним винаходом, та такі, що експресують поліпептиди, які кодує полінуклеотидами, також охоплю-

ються даним винаходом. Рослини та рослинні тканини, що експресують мутантні полінуклеотиди, забезпечують тканини, що мають, наприклад, знижену втрату ваги або врожаю, які індуковані тепловим впливом, коли піддаються тепловому стресу під час розвитку. Рослини, що охоплюються даним винаходом, включають однодольні рослини, такі, як рис, пшениця, ячмінь, овес, сорго, кукурудза, лілії, просо, та дводольні рослини, такі, як горох, люцерна, турецький горох, цикорій, конюшина, кормова капуста, сочевиця, трава для газонів, соя, тютюн, картопля, топінамбур, редиска, кочанна капуста, рапс, яблуня, салат-латук. В особливо бажаному втіленні рослини представляють собою злакові. Злаки, до яких застосовують даний винахід, включають, наприклад, кукурудзу, пшеницю, рис, ячмінь, овес, жито та просо.

Об'єкт даного винаходу також відноситься до способів одержання та ідентифікації полінуклеотидів та поліпептидів, що охоплюються даним винаходом. В одному втіленні мутації генів, після проведення яких рослини піддають селекції при використанні бактеріальних експресійних систем, можуть використовуватися для ізоляції молекул полінуклеотидів, що кодують субодиниці рослинних AGP, які мають несуть мутації, що можуть пом'якшувати теплоіндуковані втрати при біосинтезі крохмалю в рослинах, індивідуальні амінокислотні заміни можуть бути поєднані в одну субодиницю, як описано в даній заявці.

Об'єкт даного винаходу також стосується рослин та рослинних тканин, що містять полінуклеотид за даним винаходом. У бажаному втіленні рослина або рослинна тканина має мутантний ген AGP за винаходом, що вбудований в рослинний геном. У бажаному втіленні рослина є злаковою рослиною. Більш бажано, коли рослина представляє собою *Zea mays*. Рослини, що мають мутантний ген AGP, можуть вирощуватися з насіння, що включає мутантний ген у своєму геномі. Крім того, способи трансформації рослин геном, такі, як інфікування *Agrobacterium tumefaciens*, балістичні способи, тощо, добре відомі у даній галузі техніки.

З причини виродженості генетичного коду різноманітність різних полінуклеотидних послідовностей може кодувати кожний з варіантних поліпептидів AGP, розкритих в даній заявці. Крім того, середній спеціаліст у даній галузі може легко створити альтернативні полінуклеотидні послідовності, що кодують такий самий або суттєво такий самий поліпептид за даним винаходом. Як такий, що використовується в контексті даної заявки, термін «суттєво такий самий» відноситься до послідовностей, які кодують амінокислотні заміни, делеції, доповнення або вставки, що не змінюють матеріально функціональну активність поліпептиду, який кодується мутантною послідовністю AGP, що описана в даній заявці.

Як такі, що використовуються в контексті заявки, терміни "нуклеїнова кислота" та "полінуклеотидна послідовність" відносяться до полімеру дезоксирибонуклеотиду або рибонуклеотиду в одноланцюговій або дволанцюговій формі та, якщо інше не вказано, будуть охоплювати відомі аналоги природних нуклеотидів, що можуть функ-

ціонувати таким самим чином, що й існуючі в природі нуклеотиди. Полінуклеотидні послідовності включають як послідовність ланцюга ДНК, що транскрибується в РНК, так і послідовність РНК, що транскрибується у білок. Полінуклеотидні послідовності включають як послідовності повної довжини, так і коротші послідовності, що мають походження від послідовностей повної довжини. Зрозуміло, що специфічні полінуклеотидні послідовності включають вироджені кодони природної(их) послідовності(ей), що можуть бути введені для забезпечення переважних кодонів в специфічних хазяйських клітинах. Апельні варіації представлених послідовностей також входять в об'єм даного винаходу. Полінуклеотидні послідовності, що входять в об'єм даного винаходу, також включають послідовності, які специфічно гібридизуються з проедставленими послідовностями. Полінуклеотиди включають як смислові, так і антисмислові ланцюги, а також індивідуальні ланцюги або одноланцюгові або дволанцюгові молекули.

Заміни амінокислот, відмінні від тих, що специфічно представлені у мутантах, розкритих у даній заявці, також входять в об'єм даного винаходу. Амінокислоти можуть бути розподілені у наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні та кислотні. Консервативні заміни, за допомогою яких мутантний поліпептид AGP, що має амінокислоти одного класу, замінюються іншими амінокислотами того самого класу, також входять в об'єм даного винаходу, при умові, що мутантний поліпептид AGP, який має заміни, ще зберігає підвищену теплостабільність у порівнянні з поліпептидом дикого типу. Таблиця 2 нижче забезпечує приклади амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця 2

Клас амінокислот	Приклади амінокислот
Неполярні	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Незаряджені полярні	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Кислотні	Asp, Glu
Основні	Lys, Arg, His

Наприклад, заміна тирозину у положенні 333 у HS 33, HS 7+3, HS 6+3 та HS 7+6+3 мутантів іншими амінокислотами, такими, як гліцин, серин, треонін, цистеїн, аспарагін та глутамін, входить в об'єм даного винаходу. Заміни або фенілаланіну, або метіоніну у положенні 333 у великій субодиниці AGP також специфічно охоплюються даним винаходом. Таким чином, комбінації фенілаланіну або метіоніну у положенні 333 з валіном у положенні 177, або з валіном у положенні 396, або обидві ці заміни також специфічно охоплюються даним винаходом. Подібно до цього, заміни валіну у положенні 177 та 396 у RTS 48-2, RTS 60-1, HS 7+3, HS 6+3, HS 7+6 та HS 7+6+3 мутантах іншими амінокислотами, такими, як лейцин, ізолейцин, пролін, метіонін, фенілаланін та триптофан, охоплюються даним винаходом. Амінокислотні заміни у

положеннях, відмінних від сайту теплостабільних мутацій, також охоплюються даним винаходом, за умови, що поліпептид зберігає підвищену теплостабільність або надає підвищеної теплостабільності у порівнянні з поліпептидом дикого типу.

Поліпептиди та білки, що складають об'єкт даного винаходу, можуть також бути визначені у границях специфічної ідентичності та/або подібності з тими, що представлені у даній заявці. Ідентичність типово буде більше 60%, бажано більше 75%, більш бажано більше 80%, навіть більш бажано 90%, і може бути більшою за 95%. Ідентичність та/або подібність послідовності може бути 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% у порівнянні з послідовністю, представленою у даній заявці. Як використовується в контексті даної заявки, якщо інше не вказано, то процент ідентичності та/або подібності двох послідовностей може бути визначений при використанні алгоритму Karlin та Altschul (Karlin та Altschul [1990] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268), модифікованому, як описано у Karlin та Altschul (Karlin та Altschul [1993] Proc. Natl. Sci. USA 90: 5873-5877). Такий алгоритм вводиться в NBLAST та XBLAST програми Altschul та ін. (Altschul та ін. [1990] J. Mol. Biol. 215: 402-410). Дослідження BLAST може бути проведене за допомогою N BLAST програми, бальна оцінка=100, довжина слова=12, для одержання послідовностей з бажаним процентом ідентичності послідовностей. Для одержання вирівнювання з розривами для цілей порівняння, Gapped BLAST може використовуватися так, як описано у Altschul та ін. (Altschul та ін. [1997] Nucl. Acid Res. 25: 3389-3402). При використанні BLAST та Gapped BLAST програм можуть використовуватися значення параметрів по умовчання відповідних програм (NBLAST та XBLAST). Дивися NCBI/NIH веб-сторінка.

Об'єкт даного винаходу також стосується поліпептидів, які кодуєть фрагменти мутантних поліпептидів повної довжини, за умови, що ці фрагменти зберігають суттєво таку саму функціональну активність, що й поліпептид повної довжини. Фрагменти мутантного поліпептиду AGP, що кодується цими поліпептидами, також входять в об'єм даного винаходу. Фрагменти послідовності повної довжини можуть бути приготовлені при використанні стандартних методів, що відомі у даній галузі техніки.

Об'єкт даного винаходу також охоплює такі поліпептидні молекули, які кодуєть ферменти біосинтезу крохмалю, які мають послідовності, що є достатньо гомологічними з послідовністю дикого типу, настільки, щоб дозволити проводити гібридизацію з послідовністю в жорстких умовах та за допомогою стандартних способів (Maniatis, T. E.F. Fritsch, J. Sambrook [1982] Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Як такий, що використовується в контексті даної заявки, термін "жорсткі" умови гібридизації відноситься до умов, в яких гібридизацію типово виконують протягом ночі при температурі, що на 20-25°C нижче від температу-

ри плавлення (T_m) гібридної молекули ДНК, в 6 x SSPE, 5 x розчині Денхарда, 0,15 SDS, 0,1 мг/мл денатурованої ДНК. Температура плавлення описується наступною формулою (Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas та F.C. Kafatos [1983] Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman та R. Moldave [ред.] Academic Press, New York 100: 266-285):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log[\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{G+C}) - 0,61 (\% \text{формаміду}) - 600 / \text{довжина дуплекса у парах основ}.$$

Промивання типово виконували, як описано нижче:

(1) Двічі при кімнатній температурі протягом 15 хвилин в 1xSSPE, 0,1% SDS (промивання низької жорсткості).

(2) Один раз при T_m-20°C протягом 15 хвилин в 0,2xSSPE, 0,1% SDS (промивання помірної жорсткості).

Молекули поліпептидів об'єкту даного винаходу можуть використовуватися при трансформації рослин для експресії мутантного теплостабільного ферменту в цих рослинах. Крім того, поліпептиди об'єкту даного винаходу можуть використовуватися для експресії рекомбінантного варіантного ферменту. Вони також можуть використовуватися як зразок для визначення споріднених ферментів. Поліпептиди можуть також використовуватися як стандарти розміру ДНК.

Молекули поліпептидів за даним винаходом також можуть включати ті поліпептиди, що кодуєть ферменти біосинтезу крохмалю, такі, як ферменти AGP, що містять мутації, які можуть забезпечувати підвищену вагу насіння, у доповнення до поліпшеної теплостабільності, у рослинах, що експресують ці мутанти. Поєднання теплостабілізуючої мутації, такої, як наприклад, Sh2-HS 7+6 або Sh2-HS 7+3, з мутацією, що підвищує вагу насіння, наприклад, Rev6, у поліпептиді, що кодує велику субодиницю AGP кукурудзи, специфічно охоплюється даним винаходом. [Патенти США № 5,589,618 та 5,650,557] розкривають поліпептиди (наприклад, Rev6), які кодуєть мутації у великій субодиниці AGP, що надають підвищеної ваги насінню у рослин, які експресують мутантний поліпептид.

Мутації субодиниць AGP, що забезпечують теплостабільність, можуть бути поєднані у відповідності з об'єктом винаходу з нечутливими до фосфату мутаціями кукурудзи, такими, як мутація Rev6, для поліпшення стабільності Rev6, що кодується великою субодиницею.

Очікується, що ферментативна активність SSS буде пошкоджуватися при більш високих температурах, ніж та, що спостерігаються для AGP. Таким чином, піддані мутагенезу форми SSS можуть експресуватися в умовах підвищеної температури (42°C) для ізоляції теплостабільних варіантів у відповідності зі способами, описаними в даній заявці. Такі теплостабільні мутантні форми SSS представляють собою подальші аспекти даного винаходу.

Об'єкт даного винаходу також стосується способів для підвищення характеристик врожайності рослин в умовах теплового стресу шляхом вве-

дення полінуклеотиду за даним винаходом, який включає мутацію у ферменті біосинтезу крохмалю, що забезпечує характеристики підвищення врожайності у рослин. Підвищені характеристики врожайності включають, наприклад, збільшену кількість насіння, підвищену вагу насіння, підвищену біомасу рослин та підвищений індекс збирання врожаю.

Усі патенти, патентні заявки, попередні заявки, публікації, посилення, які наводяться у даній заявці або які цитуються у даній заявці, введені в дану заявку як посилення у своїй цілісності у тій мірі, в якій вони сумісні з детально розробленими способами, що зазначені в даному описі.

Далі наводяться приклади, які ілюструють способи для застосування винаходу. Ці приклади не повинні сприйматися як такі, що обмежують даний винахід. У рамках даної заявки приводяться мас.%, а усі кількісні співвідношення розчинників у суміші є об.%, якщо інше не вказано.

Приклад 1 - аналіз АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази ендосперму кукурудзи, що має багаточисленні амінокислотні мутації.

Експресія АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази ендосперму кукурудзи. Аліквоти 100мл бульйону Лурія (75г/мл спектоміцину та 50г/мл канаміцину) інокулювали клітинами AC70R1-504 E.coli, що зберігалися в гліцерині, при цьому вказані клітини експресують або АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферазу ендосперму кукурудзи, або АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферазу бульб картоплі, клітини вирощували протягом ночі при температурі 37°C при струшуванні при 220об./хв. Ці культури використовували для інокуляції 250мл бульйону Лурія (75г/мл спектоміцину та 50г/мл канаміцину). Культури вирощували до OD₆₀₀=0,55 при температурі 37°C при струшуванні при 220об./хв. Культури індукували за допомогою 0,2мМ ізопропіл-D-тіогалактозиду та 0,02мг/мл налідиксової кислоти протягом 7 годин при кімнатній температурі при струшуванні при 220об./хв. Клітини збирали шляхом центрифугування при 3500об./хв. протягом 10 хвилин при температурі 4°C. Клітинні осадки ресуспендували в 800 л екстракційного буфера: 50мМ HEPES, pH 7,5, 5мМ MgCl₂, 5мМ, EDTA, 20% сахарози та 30% сульфату амонію. DTT (1мМ), 50г/мл лізоциму, 1г/мл пепстатину, 1г/мл лейпептину, 1г/мл антипаїну, 10г/мл хімолатину, 1мМ фториду фенілметилсульфонілу, та 1мМ бензамідину додавали до екстракційного буфера безпосередньо перед використанням. Лізати піддавали обробці ультразвуком три рази протягом 3 секунд при інкубації на льоду між обробками ультразвуком. Зразки піддавали центрифугуванню протягом 1 хвилини при 13,000об./хв. при температурі 4°C. Видаляли супернатанти та аліквотували для аналізів. Поєднання індивідуальних мутацій

Стратегія субклонування була призначена для вивчення ефектів мутацій у поєднанні з HS 33 та одна з одною. Для поєднання зворотних мутацій RTS 48-2 та RTS 60-1, плазмід, що містять кожну реверсійну мутацію (температурно чутливі бать-

ківські мутації видаляли перед поєднанням мутацій), перетравлювали за допомогою Eco RV та фрагмент розміром 339 п.о. RTS 48-2 замінювали на відповідний фрагмент RTS 60-1 (Фіг.3). Одержану плазмід позначали, як Sh2-HS 7+6. Подібну стратегію використовували для поєднання реверсійної мутації RTS 48-2 з мутацією, ідентифікованою у HS 33. Плазмід, що містять мутації, перетравлювали за допомогою Eco RV, а фрагмент розміром 339 п.о. RTS 48-2 замінювали на відповідний фрагмент HS 33. Одержану плазмід позначали як Sh2-HS 7+3. Для поєднання реверсійної мутації RTS 60-1 з мутацією, ідентифікованою в HS 33, плазмід, що містять мутації, перетравлювали за допомогою Mun I/Kpn I, а фрагмент розміром 390 п.о. RTS 60-1 замінювали відповідним фрагментом HS 33 (Фіг.3). Одержану плазмід позначали як Sh2-HS 6+3. Для того, щоб поєднати реверсійні мутації RTS 60-1 та RTS 48-2 з мутацією, ідентифікованою в HS 33, плазмід Sh2-HS 6+3 та плазмід, що містить реверсійну мутацію RTS 48-2 замінювали на відповідний фрагмент Sh2-HS 6+3. Одержану плазмід позначали як Sh2-HS 7+6+3.

Заключне секвенування усіх плазмід проводили при використанні шести праймерів для покриття цілої кодуєчої ділянки Sh2 в обох напрямках. Праймери, що використовувалися, були наступними:

LHBB1 (5'→3'):5'-CGACTACTATAGGGAGACC-3'(SEQ ID NO.5);
 LH27 (5'→3'):5'-CCCTATGAGTAAGT-3'(SEQ ID NO.6);
 LH9 (5'→3'):5'-TATACTCAATTACAT-3'(SEQ ID NO.7);
 LHBB2 (3'→5'):5'-GTGCCACCTGACGTCTAAG-3'(SEQ ID NO.8);
 LH2135 (3'→5'):5'-CAGAGCTGACACGTG-3'(SEQ ID NO.9);
 LH32 (3'→5'):5'-AAGCTGATCGCCACTC-3'(SEQ ID NO.10).

Теплова обробка АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази

Дикий тип (sh2) та мутантну форму АДФ глюкозо-1-фосфат-аденилілтрансферази, що містить одну амінокислотну мутацію (HS 33, RTS 48-2, RTS 60-1) мутацію на основі багаточисленних змін амінокислот (HS 7+3, тобто RTS 48-2 плюс HS 33; HS 6+3, тобто RTS 60-1 плюс HS33; та HS 7+6, тобто RTS 48-2 плюс RTS 60-1), аналізували на ферментативну активність перед тепловою обробкою та після теплової обробки. Теплова обробка полягала в інкубації тестового білка при 60°C протягом 5 хвилин.

Значення активності, що спостерігали після теплової обробки при 60°C протягом 5 хвилин, представлені у Таблиці 3. Генотипи у наборі даних є наступними Sh2 дикого типу, HS 33, RTS 60-1 (тільки реверсійна мутація), RTS 48-2 (тільки реверсійна мутація), Sh2-HS 7+6, Sh2-HS 6+3, Sh2-HS 7+3, та Sh2-HS 7+6+3.

Таблиця 3

Значення активності після теплової обробки

Фермент	% активності	SEM ^a	№
Sh2 дикого типу	32	11	3
HS33	69	7	7
RTS 60-1	61	13*	2
RTS 48-2	64	6	3
Sh2-HS 7+6	77	21*	2
Sh2-HS 6+3	69	9	3
Sh2-HS 7+3	83	8	3
Sh-HS 7+6+3	72	11	3

^a - стандартна похибка значення^b - кількість повторень експерименту

* - представляє інтервал, більш точний і, ніж SEM

Активність перед тепловою обробкою для Sh2 дикого типу, HS 33, RTS 60-1, RTS

48-2, Sh2-HS 7+6, Sh2-HS 6+3, Sh2-HS 7+3, та Sh2-HS 7+6+3 представлена у Таблиці 4. HS 33 мав у 2,1 разу підвищену активність, ніж Sh2 дикого типу. Їх подвійний мутант мав у 1,9 рази більшу активність. Оскільки поєднання двох мутантів підвищувало активність, подвійний мутант не мав синергічного ефекту. Мутація RTS 60-1 при поєднанні з такою HS 33 мала адитивний ефект, підвищуючи активність у 3,4 рази у порівнянні з Sh2 дикого типу. Мутація RTS 48-2 у поєднанні з такою HS 33 демонструвала трохи менше підвищення, до 2,9 разів. Цікаво, що потрійний мутант продемонстрував трохи більше підвищення, ніж тільки реверсійна мутація у другому сайті, але менше підвищення, ніж подвійний мутант реверсійних похідних у другому сайті.

Таблиця 4

Кратність підвищення активності

Фермент	Кратність підвищення	Інтервал	№
Sh2 дикого типу	н/в	н/в	н/в
HS33	2,1	0,2 ^a	3
RTS 60-1	1,4	0	1
RTS 48-2	1,4	0	1
Sh2-HS 7+6	1,9	0,2	2
Sh2-HS 6+3	3,4	0	1
Sh2-HS 7+3	2,9	0,1	2
Sh-HS 7+6+3	1,8	0,1	2

^a - стандартна похибка значення^b - кількість повторень експерименту

н/в - не використовується

Аналізи на АДФ глюкозо-1-Фосфат-аденілілтрансферазу

Для одержання кількісних даних для мутантів, описаних вище, активність вимірювали за допомогою аналізу синтезу (прямого), що визначає вбу-

довування [¹⁴C]глюкози-1-Р у цукор нуклеотиду АДФ-глюкози. Аналізи проводили на сирових ферментативних екстрактах, приготовлених так, як описано нижче.

За допомогою реакції синтезу АДФ-глюкози вимірювали вбудовування [¹⁴C]глюкози-1-Р в АДФ-глюкозу. Реакційна суміш містила 80мМ HEPES, рН 7,5, 1мМ глюкоза-1-Р, 4мМ МдCl₂, 0,5мг/мл сироваткового альбуміну великої рогатої худоби, 10мМ 3-PGA та 15,000 імпульсів/хвилина [¹⁴C] глюкози-1-Р. Реакційний об'єм складав 50мл. Аналізи ініціювали шляхом додання 1,5мМ АТФ. Реакцію проводили при інкубуванні протягом 30 хвилин при температурі 37°C та зупиняли шляхом кип'ятіння протягом 2 хвилин. Невбудовану глюкоза-1-Р видаляли шляхом додання 0,3 одиниць бактеріальної лужної фосфатази (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) та інкубували протягом 2,5 годин при температурі 37°C. Аліквоту об'ємом 20мл реакційної суміші переносили на DEAE папір, промивали за допомогою дистильованої води три рази, висушували та кількісно оцінювали на рідинному сцинтиляційному лічильнику.

Додаткові результати для мутантів, що мають одну мутацію, та подвійних мутантів показані на Фіг.2. Для комбінаційного мутанту Sh2-HS 7+6 (RTS 48-2 плюс RTS 60-1) та комбінаційного мутанту Sh2-HS 6+3 (RTS 60-1 плюс HS 33) представлені значення є середніми значеннями даних, отриманих при трьох розведеннях ферменту (у подвійній повторності), помноженими на їх фактор розведення, мінус фонове значення. Для комбінаційного мутанту Sh2-HS 7+3 (RTS 48-2 плюс HS 33) представлені значення представляють собою середнє значення двох розведень ферменту (у подвійній повторності), помножене на їх фактор розведення, мінус фонове значення. Графічне представлення значень проводили при використанні Microsoft Excel.

Приклад 2 - Поєднання теплостабільних мутацій з Rev6

Згідно з об'єктом винаходу теплостабільні мутації можуть поєднуватися з мутаціями, асоційованими зі збільшенням ваги насіння, такими, як наприклад, мутація Rev6. Задачаю є підтримання бажаних характеристик нечутливості до фосфату Rev6 при підвищенні їх стабільності. Мутанти, що включають теплостабільні мутації у поєднанні з мутацією Rev6, можуть бути сконструйовані та підтверджені так, як описано у даній заявці. Такі "комбінаційні" мутанти можуть бути трансформовані в AC70R1-504, що несе маленьку субодиницю дикого типу. Підвищена теплостабільність може бути легко ідентифікована шляхом позитивного забарвлювання глікогену у середовищі, що містить знижену концентрацію глюкози. Rev6 не забарвлюється при вирощуванні на цьому середовищі. Спочатку усі мутантні комбінації можуть піддаватися скринінгу ферментативно для підтримання нечутливості до фосфату, але далі аналізу піддаються тільки ті комбінації, що підтримують нечутливість до фосфату.

Зрозуміло, що приклади та втілення, описані в даній заявці, наведені тільки для ілюстрації, і що

різноманітні модифікації або зміни в цьому світі
будуть легко передбачені спеціалістом у даній

галузі і включаються в об'єм даного винаходу та
прикладені пункти формули.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ханнах Л.Кертис
Грін Томас В.
Бургер Брайан

<120> Теплостабільні мутанти ферментів біосинтезу крохмалю

<130> UF-305

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 33
<212> білок
<213> HS 33 мутант Zea mays

<400> 1

Leu His Asp Phe Gly Ser Glu Ile Leu Pro Arg Ala Val Leu Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Val Gln Ala Cys Ile Phe Thr Gly Tyr Trp Glu Asp Val Gly Thr
20 25 30

Ile

<210> 2
<211> 20
<212> білок
<213> RTS48-2 мутант Zea mays

<400> 2

Thr Gln Met Pro Glu Glu Pro Val Gly Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Ile Arg Lys
20

<210> 3
<211> 18
<212> білок
<213> RTS60-1 мутант Zea mays

<400> 3

Asp Lys Cys Lys Met Lys Tyr Val Phe Ile Ser Asp Gly Cys Leu Leu
1 5 10 15

Arg Glu

<210> 4
<211> 7739
<212> ДНК

<213> Shrunk-2 алель дикого типа Zea mays

<400> 4

taagaggggt gcacctagca tagatTTTTT gggctccctg gcctctcctt tttccgcct	60
gaaaacaacc tacatggata catctgcaac cagagggagt atctgatgct ttttctggg	120
caggagagc tatgagacgt atgtcctcaa agccactttg cattgtgtga aaccaatata	180
gatctttgtt acttcatcat gcatgaacat ttgtggaaac tactagctta caagcattag	240
tgacagctca gaaaaagtt atctctgaaa ggtttcatgt gtaccgtggg aaatgagaaa	300
tggtgccaac tcaaacacct tcaatatgtt gtttgaggc aaactcttct ggaagaaagg	360
tgtctaaaac tatgaacggg ttacagaaag gtataaacca cggctgtgca ttttgaagt	420
atcatctata gatgtctgtt gaggggaaag ccgtacgcca acgttattta ctacagaaaca	480
gcttcaaac acagtgtgtt gctttatgat ggcatctcca ccaggcacc caccatcacc	540
tattcaccta tctctcgtgc ctgtttattt tcttgccctt tctgatcata aaaaatcatt	600
aagagtttgc aaacatgcat aggcataatca atatgctcat ttattaattt gctagcagat	660
catcttcta ctctttactt tatttattgt ttgaaaaata tgtcctgcac ctaggagct	720
cgtatacagt accaatgcat cttcattaaa tgtgaatttc agaaaggaag taggaacct	780
tgagagtatt tttcaaaatt aattagcggc ttctattatg tttatagcaa aggccaggg	840
caaaatcgga aactaatga tggttggttg catgagctctg tcgattactt gcaagaaatg	900
tgaacctttg tttctgtgcg tgggcataaa acaaacagct tctagcctct tttacggtac	960
ttgcacttgc aagaaatgtg aactcctttt catttctgta tgtggacata atgccaaagc	1020
atccaggctt tttcatggtt gttgatgtct ttacacagtt catctccacc agtatgcct	1080
cctcactct tatataaaca catcaacagc atcgcaatta gccacaagat cacttcggga	1140
ggcaagtgtg atttcgacct tgcagccacc tttttttgtt ctgttgtaag tatactttcc	1200
cttaccatct ttatctgtta gtttaatttg taattgggaa gtattagtgg aaagaggatg	1260
agatgctatc atctatgtac tctgcaaatg catctgacgt tatatgggct gcttcatata	1320
atgtgaattg ctccattctt gccgacaata tattgcaagg tatatgccta gttccatcaa	1380
aagttctgtt ttttcattct aaaagcattt tagtggcacg caattttgtc catgagggaa	1440
aggaaatctg ttttggttac tttgcttgag gtgcattctt catatgtcca gttttatgga	1500
agtaataaac ttcagtttgg tcataagatg tcatattaaa gggcaaacat atattcaatg	1560
ttcaattcat cgtaaatgtt ccctttttgt aaaagattgc atactcattt atttgagttg	1620
caggtgtatc tagtagttgg aggagatatg cagtttgac ttgcattgga cacgaactca	1680
ggtctcacc agataagatc ttgtgagggt gatgggattg acaggttgga aaaattaagt	1740

```

attgggggca gaaagcagga gaaagctttg agaaataggt gctttggtgg tagagttgct 1800
gcaactacac aatgtattct tacctcagat gcttgcctg aaactcttgt aagtatccac 1860
ctcaattatt actcttacct gttggtttac ttacgtttg tcttttcaag ggaaatttac 1920
tgtatttttt gtgttttgtg ggagttctat acttctgttg gactgggtat tgtaaagatt 1980
tgttcaaata gggcatccta ataattgttt gaaatctggg aactgtggtt tcaactgcgtt 2040
caggaaaaag tgaattattg gttactgcat gaataactta tggaaataga ccttagagtt 2100
gctgcatgat tatcacaaat cattgctacg atatcttata atagtctctt cgacctcgca 2160
ttacatatat aactgcaact cctagtgtcg ttcaaaaaaa aaaatgcaac tcttagaacg 2220
ctcaccagtg taatctttcc tgaattgtta tttaatggca tgtatgcaact acttgataac 2280
ttatctagga ttaagtaatc taactctagg ccccatatct gcagcattct caaacacagt 2340
cctctaggaa aaattatgct gatgcaaacc gtgtatctgc tatcattttg ggcggaggca 2400
ctggatctca gctctttcct ctgacaagca caagagctac gcctgctgta agggataaca 2460
ctgaacatcc aacgttgatt actctattat agtattatac agactgtact tttcgaattt 2520
atcttagttt tctacaatat ttagtggatt cttctcattt tcaagataca caattgatcc 2580
ataatcgaag tggatgttaa gacagtgagt taaaagatta tatttttttg gagacttcca 2640
gtcaaatttt cttagaagtt tttttggtcc agatgttcat aaagtcgccg ctttcatact 2700
ttttttaatt ttttaattgg tgcactatta ggtacctgtt ggaggatgtt acaggcttat 2760
tgatatccct atgagtaact gcttcaacag tggataaaat aagatatttg tgatgagtca 2820
gttcaattct acttcgctta accgccatat tcatcgtaca taccttgaag gcgggatcaa 2880
ctttgctgat ggatctgtac aggtgattta cctcatcttg ttgatgtgta atactgtaat 2940
taggagtaga tttgtgtgga gagaataata aacagatgcc gagattcttt tctaaaagtc 3000
tagatccaaa ggcattgttg ttcaaaacac tatggacttc taccatttat gtcattactt 3060
tgccttaatg ttccattgaa tggggcaaat tattgattct acaagtgttt aattaaaaac 3120
taattgttca tctgcagggt attagcggct acacaaatgc ctgaagagcc agctggatgg 3180
ttccagggtg cagcagactc tatcagaaaa ttatctctgg tactcgaggt agttgatatt 3240
ttctcgttta tgaatgtcca ttcactcatt cctgtagcat tgtttctttg taattttgag 3300
ttctcctgta tttctttagg attattacag tcacaaatcc attgacaaca ttgtaatctt 3360
gagtggcgat cagctttatc ggatgaatta catggaactt gtgcaggat ggtgttctct 3420
tgttctcat gtttcacgta atgtcctgat tttggattaa ccaactactt ttggcatgca 3480
ttatttccag aaacatgtcg aggacgatgc tgatatact atatcatgtg ctctgttga 3540
tgagaggtaa tcagttgttt atatcatcct aatatgaata tgatcatctg ttatccaaca 3600
caggatgcat atggtctaata ctgctttcct tttttttccc ttcggaagcc gagcttctaa 3660

```

aaatgggcta gtgaagattg atcatactgg acgtgtactt caattctttg aaaaacccaaa	3720
gggtgctgat ttgaattcta tggtagaaa ttccttggt aatccaattc tttgttttc	3780
ctttctttct tgagatgaac ccctctttta gttatttcca tggataacct gtacttgact	3840
tattcagaaa tgattttcta ttttgctgta gaatctgaca ctaaagctaa tagcactgat	3900
gttgagaga gttgagacca acttctgag ctatgctata gatgatgcac agaaatatcc	3960
ataccttgca tcaatgggca tttatgtctt caagaaagat gcacttttag accttctcaa	4020
gtaatcactt tcctgtgact tatttctatc caactctag tttaccttct aacagtgtca	4080
attcttaggt caaaatatac tcaattacat gactttggat ctgaaatcct cccaagagct	4140
gtactagatc atagtgtgca ggtaagtctg atctgtctgg agtatgtgtt ctgtaaactg	4200
taaattcttc atgtcaaaaa gttgtttttg tttccagttt ccactaccaa tgcacgattt	4260
atgtattttc gcttccatgc atcacacata ctaacaatac attttacgta ttgtgttagg	4320
catgcatttt tacgggctat tgggaggatg ttggaacaat caaatcattc tttgatgcaa	4380
acttggccct cactgagcag gtactctgtc atgtattctg tactgcatat atattacctg	4440
gaattcaatg catagaatgt gttagaccat cttagtcca tctgttttc ttcaattagc	4500
ttatcattta atagtgttg gctagaattt aaacacaaat ttacctataa tgtttctctc	4560
ttcagccttc caagtttgat ttttacgac caaaaacacc tttcttact gcacccgat	4620
gcttgccctc gacgcaattg gacaagtgc aggtatatgt cttactgagc acaattgtta	4680
cctgagcaag attttgtgta cttgacttgt tctcctccac agatgaaata tgcatttacc	4740
tcagatgggt gcttactgag agaattgcaac atcgagcatt ctgtgattgg agtctgtc	4800
cgtgtcagct ctggatgtga actcaaggta catactctgc caatgtatct actcttgagt	4860
ataccatttc aacaccaagc atcaccaa atcacagaa aatagcaaca aagcctttta	4920
gttccaagca atttagggtg gcctagagtt gaaatctaac aaaacaaaag tcaaagctct	4980
atcacgtgga tagttgtttt ccattgcactc ttatttaagc taattttttg ggtatactac	5040
atccatttaa ttattgtttt attgcttctt ccctttgctt tccccctatt actatcgct	5100
cttaagatca tactacgcac tagtgtcttt agaggctctt ggtggacatg ttcaaaccat	5160
ctcaatcggg gttggacaag tttttcttga atttgtgcta cacctaacct atcacgtatg	5220
tcattcgttc aaactcgac cttctgtat catcataaat ccaatgcaac atacgcattt	5280
atgcaacatt tatctgttga acatgtcatc tttttgtagg ttaacattat gcaccatata	5340
atgtagcatg tctaatacat atcctataaa atttacattt tagcttatgt ggtatcctct	5400
tgccacttag aacaccatat gcttgatgcc atttcatcca cctgctttg attctatggc	5460
taacatcttc attaatatcc tcgcctctct gtatcattgg tcctaaatat ggaaatacat	5520

tctttctggg cactacttga ccttccaaac taacgtctcc ttgctcctt tcttgtgtgt 5580
 agtagtaccg aagtcacatc tcatatattc ggtttttagtt ctactaagtc ccgggttcga 5640
 tccccctcag ggggtgaattt cgggcttggt aaaaaaaatc ccctcgctgt gtcccgcccg 5700
 ctctcgggga tcgatatact gcgcgccacc ctccggctgg gcattgcaga gtgagcagtt 5760
 gatcggctcg ttagtgatgg ggagcggggg tcaagggttt tctcgcccg gaccatgttt 5820
 cggctctctta atataatgcc gggagggcag tctttccctc cccggtcgag ttttagttct 5880
 accgagtcta aaacctttgg actctagagt cccctgtcac aactcacaac tctagttttc 5940
 tatttacttc tacctagcgt ttattaatga tcaactatc gtctgtaaaa agcatacacc 6000
 aatgtaatcc ccttgatgt ccttgtaat attatccatc acaagaaaa aaggtaaggc 6060
 tcaaagttga cttttgatag agtcctattc taatcgagaa gtcactctga tcttcgtctc 6120
 ttgttcgaac actagtcaca aaattttttg tacatgttct taatgagtc aacgtaatat 6180
 tccttgatat ttgtgcataa gccctcatca agtcaatgaa aatcacgtgt aggtccttca 6240
 ttgttcctt atactgctcc atcacttgtc tcattaagaa aatctctctc atagttaacc 6300
 ttttggcatg aaacaaaaac acacagaagt tgtttccttt ttttaagatc ccacacaaaa 6360
 gaggtttgat ctaaggaatc tggatccctg acaggtttat caaaatcctt tgtgtttttc 6420
 ttaaaactga atattcctcc agcttctagt attgatgtaa tattcaatct gtttagcaag 6480
 tgaacacctt gggtcttggt gttactgtac ccccccccc ccccccccc cgaggcccag 6540
 attaccacga catgaataga agaattatga acccagatct agagtttggt tgtactgttg 6600
 aaaatcgggt acaattcatt ttgttattgc gctttctgat aacgacagga ctccgtgatg 6660
 atgggagcgg acacctatga aactgaagaa gaagcttcaa agctactgtt agctgggaag 6720
 gtcccagttg gaataggaag gaacacaaag ataagggtgag tatggatgtg gaaccaccgg 6780
 ttagttccca aaaatatcac tcaactgatac ctgatgggat cctctgatta ttttcaggaa 6840
 ctgtatcatt gacatgaatg ctaggattgg gaagaacgtg gtgatcaca acagtaagg 6900
 gagcgagcgc acctacatgg gtgcagaatc ttgtgtgctc atctatccta attcggtaat 6960
 tcctatccag cgctagtctt gtgacctgg ggcatgggtt cgactctgtg acagggcatc 7020
 caagaggctg atcacccgga agaagggtac tacataagg 6980 ctggaatcgt ggtgatcttg 7080
 aagaatgcaa ccatcaacga tgggtctgtc atatagatcg gctgcgtgtg cgtctacaaa 7140
 acaagaacct acaatgggtat tgcacgatg gatcgtgtaa ccttggtatg gtaagagccg 7200
 cttgacagaa agtcgagcgt tcgggcaaga tgcgtagtct ggcatgctgt tccttgacca 7260
 tttgtgctgc tagtatgtac tgttataagc tgccctagaa gttgcagcaa acctttttat 7320
 gaacctttgt atttccatta cctgctttgg atcaactata tctgtcatcc tatatattac 7380

taaatatttta cgtgttttttc taattcgggtg ctgctttttgg gatctgggctt cgatgaccgc 7440
 tcgaccctgg gccattgggtt cagctctgtt ccttagagca actccaagga gtcctaaatt 7500
 ttgtattaga tacgaaggac ttcagccgtg tatgtcgtcc tcaccaaacg ctctttttgc 7560
 atagtgcagg ggtttagtagac ttgtagccct tgtttaaaga ggaatttgaa tatcaaatta 7620
 taagtattaa atatataattt aattagggtta acaaatttgg ctcgttttta gtctttatatt 7680
 atgtaattag ttttaaaaat agacctatat ttcaatacga aatatcatta acatcgata 7739

<210> 5
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 5

cgactcacta tagggagacc 20

<210> 6
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 6

ccctatgagt aactg 15

<210> 7
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 7

tataactcaat tacat 15

<210> 8
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 8

gtgccacctg acgtctaag 19

<210> 9
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 9

cagagctgac acgtg

15

<210> 10
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 10

aagctgatcg ccactc

16

-1020 TGATGCTTTTCTGGGCAGGGAGAGCTATGAGACGTATGTCCTCAAAGCCACTTTGCAT
 -960 TGTGTGAAACCAATATCGATCTTTGTTACTTCATCATGCATGAACATTGTGGAACTAC
 -900 TAGCTTACAAGCATTAGTGACAGCTCAGAAAAAGTTATCTCTGAAAGGTTTCATGTGTA
 -840 CCGTGGGAAATGAGAAATGTTGCCAACTCAAACACCTTCAATATGTTGTTTGCAGGCAAA
 -780 CTCTTCTGGAAGAAAGGTGTCTAAACTATGAACGGGTACAGAAAGGTATAAACACCGG
 -720 CTGTGCATTTTGGAAAGTATCATCTATAGATGTCTGTTGAGGGGAAAGCCGTACGCCAACG
 -660 TTATTTACTCAGAAACAGCTTCAACACACAGTTGTCTGCTTTATGATGGCATCTCCACCC
 -600 AGGCACCCACCATCACCTATTACCTATCTCTCGTGCCTGTTTATTTTCTGCCCTTTCT
 -540 GATCATAAAAAATCATTAAGAGTTTGCAAACATGCATAGGCATATCAATATGCTCATTTA
 -480 TTAATTGCTAGCAGATCATCTTCTACTCTTTACTTTTATTTATGTTTGAAAAATATGT
 -420 CCTGCACCTAGGGAGCTCGTATACAGTACCAATGCATCTTCATTAAATGTGAATTTCA
 -360 AAGGAAGTAGGAACCTATGAGAGTATTTTCAAAATTAATTAGCGGCTTCTATTATGTTT
 -300 ATAGCAAAGGCCAAGGGCAAAATCGGAACACTAATGATGGTTGGTTGCATGAGTCTGTCTG
 -240 ATTACTTGCAAGAAATGTGAACCTTTGTTTCTGTGCGTGGGCATAAAACAAACAGCTTCT
 -180 AGCCTCTTTTACGGTACTTGCACTTGCAAGAAATGTGAACCTCTTTTCATTTCGTATGT
 -120 GGACATAATGCCAAAGCATCCAGGCTTTTTCATGGTTGTTGATGTCTTTACACAGTTTCA
 -60 CTCCACCAGTATGCCCTCCTCATACTCTATATAAACACATCAACAGCATCGCAATTAGCC
 1 ACAAGATCACTTCGGGAGGCAAGTGTGATTTCGACCTTGACCCACCTTTTTTGTTCG
 61 TTgtaagtatactttcccttaccatctttatctgttagtttaatttgtaattgggaagta
 121 ttagtggaaagaggatgagatgctatcatctatgtactctgcaaatgcatctgacgttat
 181 atgggctgcttcatataatttgaaattgctccattcttgccgacaatatattgcaaggtat
 241 atgcttagttccatcaaaagttctgttttttcatctctaaaagcattttagtggcacgcaa
 301 ttttgtecatgagggaaaggaaatctgttttggttactttgcttgaggtgcattcttcat
 361 atgtccagttttatggaagtaataaaacttcagtttggtcataagatgtcatattaaaggg
 421 caaacatatattcaatgttcaattcatcgtaaatgttcccttttgtaaaagattgcata
 481 ctcattttatttgagttgcagGTGTATCTAGTAGTTGGAGGAGATATGCAGTTTGCACTTG

Фиг. 1А

M Q F A L

541 CATTGGACACGAACTCAGGTCCTCACCAGATAAGATCTTGTGAGGGTGATGGGATTGACA
 A L D T N S G P H Q I R S C E G D G I D
 601 GGTGGAAAAATTAAGTATTGGGGGCAGAAAGCAGGAGAAAGCTTTGAGAAATAGGTGCT
 R L E K L S I G G R K Q E K A L R N R C
 661 TTGGTGGTAGAGTTGCTGCAACTACACAATGTATTCTTACCTCAGATGCTTGTCTGAAA
 F G G R V A A T T Q C I L T S D A C P E
 721 CTCTTgtaagtatccacctcaattattactcttacctggttggtttactttacgtttgtct
 T L
 781 tttcaagggaatttactgtattttttgtgtttgtgtggagttctatacttctgttgga
 841 tgggtattgttaaagatttgttcaaataagggtcatctaaataattgtttgaaatctgggaac
 901 tgtggtttcactgcgttcaggaaaaagtgaattattggttactgcatgaataacttatgg
 961 aaatagaccttagagttgctgcatgattatcacaatcattgctacgatatttataata
 1021 gttctttcgacctcgcatattacatatataaactgcaactcctagttggttcaaaaaaaaa
 1081 atgcaactcttagaacgctcaccagtgtaattcttctgaattgttatttaattggcatgt
 1141 atgcactacttgtatacttattctaggattaagtaattcaactctaggcccatatttgca
 1201 gCATTCTCAAACACAGTCTCTAGGAAAAATTATGCTGATGCAAAACCGTGATCTGCTAT
 H S Q T Q S S R K N Y A D A N R V S A I
 1261 CATTTTGGGCGGAGGCACTGGATCTCAGCTCTTCTCTGACAAGCACAAGAGCTACGCC
 I L G G G T G S Q L F P L T S T R A T P
 1321 TGCTgtaagggataacactgaacatccaacgttgattactctattatagattatacaga
 A
 1381 ctgtacttttcgaatttatcttagttttctacaatatttagtggattcttctcattttca
 1441 agatacacaaattgatccataatcgaaagtgtatgtaagacagtgagttaaaagattatat
 1501 tttttgggagacttccagtcgaattttcttagaagtttttttggtccagatgttcataaa

Fig. 1B

1561 gtcgccgctttcactactttttttaatttttaattggtgcactattagGTACCTGTTGGA
 V P V G
 1621 GGATGTTACAGGCTTATTGATATCCCTATGAGTAACTGCTTCAACAGTGGTATAAATAAG
 G C Y R L I D I P M S N C F N S G I N K
 1681 ATATTTGTGATGAGTCAGTTCAATTCTACTTCGCTTAACCGCCATATTTCATCGTACATAC
 I F V M S Q F N S T S L N R H I H R T Y
 1741 CTTGAAGGCGGATCAACTTTGCTGATGGATCTGTACAGgtgattttacctcatctgttg
 L E G G I N F A D G S V Q
 1801 atgtgtaatactgtaattaggagtagatttgtgtggagagaataataaacagatgccgag
 1861 attctttttctaaaagctctagatccaaaggcattgtgtgttcaaacactatggacttctac
 1921 catttatgtcattactttgccttaattgttccattgaatggggcaaattattgattctaca
 1981 agtgtttaattaaaaactaattgttcatcctgcagGTATTAGCGGCTACACAAATGCCTG
 V L A A T Q M P
 2041 AAGAGCCAGCTGGATGGTTCCAGGGTACAGCAGACTCTATCAGAAAAATTTATCTGGGTAC
 E E P A G W F Q G T A D S I R K F I W V
 2101 TCGAGgtagttgatattttctcgtttatgaatgtccattcactcattcctgtagcattgt
 L E
 2161 ttctttgtaattttgagttctcctgtattttcttttagGATTATTACAGTCACAAATCCATT
 D Y Y S H K S I
 2221 GACAACATTGTAATCTTGAGTGGCGATCAGCTTTATCGGATGAATTACATGGAACCTGTG
 D N I V I L S G D Q L Y R M N Y M E L V
 2281 CAGgtatggtgttctctgttctcctcatgtttcacgtaattgtcctgattttggattaacca
 Q
 2341 actacttttggcatgcattattttccagAAACATGTCGAGGACGATGCTGATATCACTATA
 K H V E D D A D I T I

Fig. 1C

2401 TCATGTGCTCCTGTTGATGAGAGgtaatcagttggtttatatcatcctaatatgaatatgt
 S C A P V D E S
 2461 catcttggttatccaacacaggatgcatatggtctaactctgctttcctttttttcccttc
 2521 ggaagCCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGATTGATCATACTGGACGTGTAAGTCAA
 R A S K N G L V K I D H T G R V L Q
 2581 TTCTTTGAAAAACCAAGGGTGCTGATTTGAATTCTATGgtagaaattccttgtgtaat
 F F E K P K G A D L N S M
 2641 ccaattccttttggtttcctttcctttccttgagatgaacccctccttttagttatttccatgg
 2701 ataacctgtacttgacttattcagaaatgattttctattttgctgtagaatctgacacta
 2761 aagctaatagcactgatgtgtgcagAGAGTTGAGACCAACTTCTGAGCTATGCTATAGAT
 R V E T N F L S Y A I D
 2821 GATGCACAGAAATATCCATACCTTGCATCAATGGGCATTTATGTCTTCAAGAAAGATGCA
 D A Q K Y P Y L A S M G I Y V F K K D A
 2881 CTTTTAGACCTTCTCAAgtaatcactttcctgtgacttatttctatccaactcctagttt
 L L D L L K
 2941 accttctaacagtggtcaattccttagGTCAAAATATACTCAATTACATGACTTTGGATCTG
 S K Y T Q L H D F G S
 3001 AAATCCTCCCAAGAGCTGTACTAGATCATAGTGTGCAGgtaagtctgatctgtctggagt
 E I L P R A V L D H S V Q
 3061 atgtggttctgtaaactgtaaattccttcatgtcaaaaagttggtttttggttccagtttcca
 3121 ctaccaatgcacgatttatgtattttcgttccatgcatcatacataactaacaatacatt
 3181 ttacgtattgtgttagGCATGCAATTTTACGGGCTATTGGGAGGATGTTGGAACAATCAA
 A C I F T G Y W E D V G T I K
 3241 ATCATTTCTTTGATGCAAACTTGGCCCTCACTGAGCAGgtactctgtcatgtattctgtac

Φir.1D

 S F F D A N L A L T E Q
 3301 tgcataatattacctggaattcaatgcatagaatgtgttagaccatcttagttccatcc
 3361 tgttttcttcaattagcttatcatttaatagttgttggctagaatttaaacacaaattta
 3421 cctaataatgtttctctcttccagCCTTCCAAGTTTGATTTTACGATCCAAAAACACCTTT
 P S K F D F Y D P K T P F
 3481 CTTCAGTGCACCCCGATGCTTGGCTCCGACGCAATTGGACAAGTGCAAGgtatatgtcctt
 F T A P R C L P P T Q L D K C K
 3541 actgagcacaattgtttacctgagcaagattttgtgtacttgacttgttctcctccacagA
 3601 TGAAATATGCATTTATCTCAGATGGTTGCTTACTGAGAGAATGCAACATCGAGCATTCTG
 M K Y A F I S D G C L L R E C N I E H S
 3661 TGATTGGAGTCTGCTCACGTGTCAGCTCTGGATGTGAACTCAAGgtacataactctgcca
 V I G V C S R V S S G C E L K
 3721 tgtatctactccttgagtataccatttcaacaccaagcatcaccaaatacacagaacaat
 3781 agcaacaaagccttttagttccaagcaatttagggtagcctagagttgaaatctaacaaa
 3841 acaaaagtcaaagctctatcacgtggatagttgttttccatgcactcttatttaagctaa
 3901 ttttttgggtatactacatccatttaattattgttttattgcttcttccctttgctttc
 3961 cccattactatcggttcttaagatcatactacgcactagtgtcttttagaggtctctggg
 4021 ggacatgttcaaaccatctcaatcggtgttggacaagtttttcttgaatttgtgctacac
 4081 ctaacctatcacgtatgtcatcgtttcaactcgatccttctgtatcatcataaatcca
 4141 atgcaacatacgcatttatgcaacatttatctgttgaacatgtcatctttttgtaggtta
 4201 acattatgcaccatacaatgtagcatgtctaatcatcatcctataaaaatttacatttttag
 4261 cttatgtggtatcctcttggcacttagaacaccatagcttgatgccatttcatccacc
 4321 tgctttgattctatggctaacatcttcattaatatcctcgctctctgtatcattggtcc

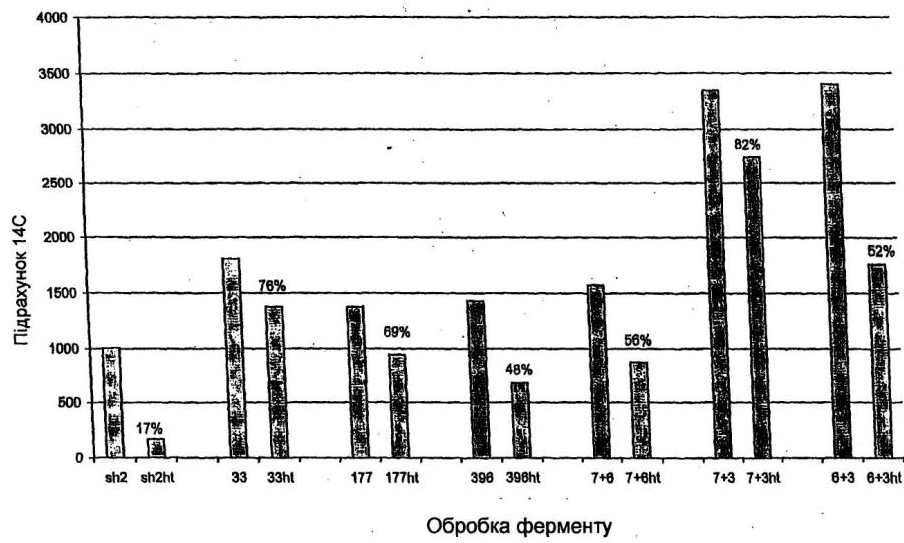
Φir.1E

4381 taaatatggaaatacattctttctgggcactacttgaccttccaaactaacgtctccttt
 4441 gctcctttcttggtagtagtagtaccgaagtcacatctcatatattcggttttagttcta
 4501 ctaagtcctgggttcgatccccctcaggggtgaatttcgggcttggtaaaaaaatcccc
 4561 tcgctgtgtcccgcccgctctcggggatcgatatcctgcgcgccaccctccggctgggca
 4621 ttgcagagtgcagcagttgatcggtcggttagtgatggggagcggggttcaagggttttct
 4681 cggccgggaccatgtttcggtctcttaataataatgccgggagggcagtccttccctcccc
 4741 ggctcgagtttttagttctaccgagtcataaacctttggactctagagtcctctgtcacaac
 4801 tcacaactctagttttctatttacttctacctagcgtttattaatgatcactatctcgtc
 4861 tgtaaaaagcatacaccaatgtaatcccccttgatgtcccttgtaattatccatcaca
 4921 agaaaaaaaggtaaggctcaaagttgacttttgatatagtcctatttctaatacgagaagtc
 4981 atctgtatcttcgtctcttgggtcgaacactagtcacaaaattttttgtacatgttcttaa
 5041 tgagtccaacgtaataattccttgatattttgtcataagccctcatcaagtcaatgaaaat
 5101 cactgttaggtccttcatttgggtccttatactgctccatcacttgctctcattaagaaaat
 5161 ctctctcatagttaaaccttttggcatgaaacaaaatcacacagaagttgtttcctttttt
 5221 taagatcccacacaaaagaggtttgatctaaggaatctggatccctgacaggtttatcaa
 5281 aatccttttggtgtttttcttaaaactgaataattcctccagcttctagatttgatgtaatat
 5341 tcaatctgttttagcaagtgaacaccttgggtcttctgtgttactgtacccccccccccc
 5401 ccccccccgaggccagattaccacgacatgaatacaagaatattgaaccagatctaga
 5461 gtttgtttgtactgttgaaaatcggtgacaattcattttgttattgcgctttctgataac
 5521 gacagGACTCCGTGATGATGGGAGCGGACACCTATGAACTGAAGAAGAAGCTTCAAAGC
 D S V M M G A D T Y E T E E E A S K
 5581 TACTGTTAGCTGGGAAGGTCCCAGTTGGAATAGGAAGGAACACAAAGATAAGgtgagtat
 L L A G K V P V G I G R N T K I R
 5641 ggatgtggaaccaccggttagttcccaaaaatatcactcactgatacctgatggtatcct

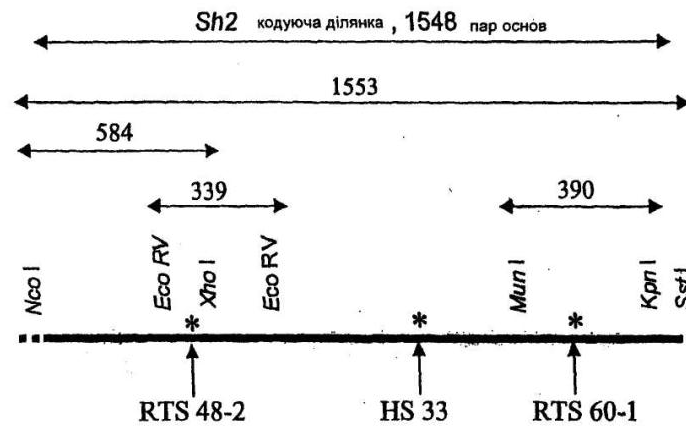
Fig. 1F

5701 ctgattattttcagGAACTGTATCATTGACATGAATGCTAGGATTGGGAAGAACGTGGTG
 N C I I D M N A R I G K N V V
 5761 ATCACAACAGTAAGgtgagcgagcgacctacatgggtgcagaatcttgtgtgctcatc
 I T N S K
 5821 tatectaattcggttaattcctatccagcgctagtccttgtagccatggggcatgggttcga
 5881 ctctgtgacagGGCATCCAAGAGGCTGATCACCCGGAAGAAGGGTACTACATAAGGTCTG
 G I Q E A D H P E E G Y Y I R S
 5941 GAATCGTGGTGATCTTGAAGAATGCAACCATCAACGATGGGTCTGTCTATATAGATCGGCT
 G I V V I L K N A T I N D G S V I -
 6001 GCGTGTGCGTCTACAAAACAAGAACCTACAATGGTATTGCATCGATGGATCGTGTAACT
 6061 TGGTATGGTAAGAGCCGCTTGACAGAAAGTCGAGCGTTTCGGGCAAGATGCGTAGTCTGGC
 6121 ATGCTGTTCCCTTGACCATTTGTGCTGCTAGTATGTACTGTTATAAGCTGCCCTAGAAGTT
 6181 GCAGCAAACCTTTTATGAACCTTTGTATTTCCATTACCTGCTTTGGATCAACTATATCT
 6241 GTCATCCTATATATTAATAAATTTTACGTGTTTTCTAATTCGGTGCTGCTTTTGGGAT

Fig. 1G



Фіг.2



Фіг.3