



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 120742

(13) C2

(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

A01H 6/20 (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 03228	(72) Винахідник(и):	Дікелвер Расселл (US),
(22) Дата подання заявки:	22.10.2010		Гупта Манджу (US),
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.02.2020		Міллер Джеффрі К. (US),
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/279,528		Новак Стефен (US),
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	22.10.2009	(73) Власник(и):	ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ,
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.10.2015, Бюл.№ 19		46268-1054, USA (US),
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.02.2020, Бюл.№ 3		САНГАМО БАЙОСАЙЄНСІЗ, ІНК.,
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201206147, 22.10.2010		Point Richmond Tech Center, 501 Canal Blvd.,
			Suite A100, Richmond, California 94804, USA
		(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
		(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2004204345 A1, 14.10.2004
			WO 0009721 A1, 24.02.2000
			US 2002178467 A1, 28.11.2002
			SALAS JOAQUIN J et al. Characterization of
			substrate specificity of plant FatA and FatB
			acyl-ACP thioesterases. Archives of
			biochemistry and biophysics, 2002, Vol. 403,
			no. 1, P. 25 – 34

(54) КОНСТРУЙОВАНИЙ БЛОК З ЦИНКОВИМИ ПАЛЬЦЯМИ, НАПРАВЛЕНИЙ НА ГЕНИ РОСЛИН, ЗАЛУЧЕНІ ДО БІОСИНТЕЗУ ЖИРНИХ КИСЛОТ**(57) Реферат:**

Винахід стосується конструйованого білка з цинковими пальцями, що модулює експресію ендогенного гена тіоестерази жирних кислот В (*FatB*) рослин, де білок з цинковими пальцями містить області розпізнавальних спіралей, полінуклеотиду, способу модифікації одного або більше гена *FatB* у рослинній клітині, рослинної клітини, рослини, насіння рослини та потомства рослини.

UA 120742 C2

Перехресне посилання на споріднені заявки

По заявці заявляється пріоритет попередньої заявки США № 61/279528, поданої 22 жовтня 2010 року, опис якої, таким чином, в повному об'ємі включений в цей документ за допомогою посилання.

5 Галузь техніки

Опис в основному стосується галузей геномної інженерії і експресії білків в рослинах. Зокрема, даний винахід стосується конструювання ДНК-зв'язувальних доменів, наприклад білків з цинковими пальцями, направлених на гени, залучені до синтезу жирних кислот, і способів використання таких білків з цинковими пальцями для модуляції експресії генів, інактивації генів і

10 направленої модифікації генів для отримання рослин із зміненими профілями жирних кислот.

Попередній рівень техніки

Дієти з високим вмістом насичених жирів збільшують вміст ліпопротеїнів низької густини (LDL), що, в свою чергу, викликає відкладення холестерину на кровоносних судинах, попередня умова тісно корелює з атеросклерозом і ішемічною хворобою серця (Conner et al., Coronary Heart Disease: Prevention, Complications, and Treatment, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1984 pp. 43-64). На відміну від цього показано, що дієти з високим вмістом мононенасичених жирів послаблюють захворювання серця. Олеїнова кислота, єдина мононенасичена жирна кислота в більшості харчових рослинних олій, знижує LDL також ефективно, як і ліолева кислота, але не впливає на рівні ліпопротеїнів високої густини (HDL) (Mensink et al. (1989) New England J. Med., 321:436-441). Крім того, дієти з високим вмістом мононенасичених жирних кислот також корелюють зі зниженим систолічним артеріальним тиском (Williams et al. (1987) J. Am. Med. Assoc, 257:3251-3256, 1987).

У світлі впливу жирних кислот на дієту і здоров'я проводилися спроби змінити профіль жирних кислот рослин, що використовуються в харчових і промислових цілях. Однак загальноприйняті способи зміни рослин для поліпшення профілю жирних кислот 25 оснований на мутагенезі (наприклад, хімічний, радіаційний і т. д.) і/або селекції і вимагають часу, трудомісткі і не направлені специфічно на вибрані гени. Див., наприклад, патент США № 5861187.

Нещодавно, конструйовані ДНК-зв'язувальні домени, такі як ДНК-зв'язувальні домени мегануклеаз і білки з цинковими пальцями (ZFP), ефективно використовували для селективної 30 модуляції експресії генів і для направленої зміни послідовностей генів у рослин (див., наприклад, патенти США №№ 7262054, 7235354, 7220719, 7001768 і 6534261; патентні публікації США №№ 2008/0182332 і з серійним номером США № 12/284888). Білки з цинковими пальцями (ZFP) являють собою білки, які зв'язуються з ДНК, РНК і/або білком, специфічним для послідовності чином, за допомогою стабілізованого металом домену, відомого як цинковий палець. Див., наприклад, Miller et al. (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes et al. (1993) Sci. Amer. 268(2):56-65; і Klug (1999) J. Mol. Biol. 293:215-218. ZFP, як правило, знаходяться у факторах транскрипції, і до цього часу в декількох тисячах відомих або передбачуваних факторах транскрипції ідентифіковано більше 10000 послідовностей цинкових пальців.

ДНК-зв'язувальні домени також можна використовувати з нуклеазними домонами з отриманням сконструйованих нуклеаз. Наприклад, можна змінювати ДНК-зв'язувальний домен 40 хомінг-ендонуклеази з отриманням нової хомінг-ендонуклеази. Подібним чином, домени цинкових пальців також комбінували з нуклеазними розщеплювальними домонами з отриманням нуклеаз з цинковими пальцями (ZFN) для специфічного задання дволанцюжкового розриву в області генома, де бажана модифікація (наприклад, делеція, мутація, гомологічна рекомбінація або вставляння екзогенної послідовності) (див., наприклад, публікації патентних заявок США №№ 2007/0134796; 2005/0064474; 2008/0182332). Конструйовані ZFP значно полегшують вставляння екзогенної послідовності або модифікацію ендегенної послідовності в конкретних ділянках-мішенях у рослин і забезпечують направлену зміну геномів рослин з більшою ефективністю, ніж загальноприйняті способи (див., наприклад, патенти США №№ 7262054, 7235354, 7220719, 7001768 і 6534261).

Проте, зберігається необхідність в композиціях і способах для направленої зміни генів, залучених до синтезу жирних кислот, для отримання рослин і рослинних продуктів (наприклад, рослинних олій), що містить вибрані жирні кислоти. За допомогою продукування видів рослин зі 55 зниженими рівнями конкретних і всіх насичених жирних кислот в олії насіння можна отримувати олійні харчові продукти, що містить менше насичених жирних кислот. Такі продукти приносять користь для охорони здоров'я, знижуючи захворюваність атеросклерозом і ішемічною хворобою серця.

Суть

Даний опис стосується композицій і способів для модуляції експресії і направленої зміни в 60 цілих рослинах або в рослинних клітинах одного або декількох генів рослин, залучених до

біосинтезу жирних кислот, таким чином, змінюючи склад жирних кислот в цілій рослині або в рослинних клітинах. Цілі рослини або рослинні клітини можуть належати до односім'ядольних (однодольних) або двосім'ядольних (дводольних) видів рослин, включаючи в деяких конкретних варіантах здійснення олієпродукуючі рослини, а також включаючи культивовані клітини, клітини в рослині на будь-якій стадії розвитку і рослинні клітини, виділені з цілої рослини, і які (або їх потомство) регенерують в рослині. Рослинні клітини можуть містити одну або декілька гомеологічних або паралогічних послідовностей генів, будь-яка кількість яких або всі з них можуть бути мішенню для модифікації способами, що описуються в цьому документі.

У одному з аспектів в цьому документі описаний ДНК-зв'язувальний домен (наприклад, білок з цинковими пальцями (ZFP)), який специфічно зв'язується з геном, залученим до шляху біосинтезу жирних кислот у рослин. У деяких варіантах здійснення ген являє собою ген *Brassica napus*. У деяких конкретних варіантах здійснення, ген *Brassica napus* може кодувати ацетил-КоА-карбоксилазу (ACCase), β -кетотил-ACP-синтети (KAS, наприклад, KAS I-KAS IV), тіоестеразу жирних кислот B (FATB, наприклад, FATB1-FATB5, або інші тіоестерази пластид), синтазу жирних кислот (FAS), елонгазу жирних кислот (FAE, наприклад, FAE1), тіоестеразу жирних кислот A (FatA), десатуразу жирних кислот (Fad2, Fad3), G-3-P-дегідрогеназу пластид (GPDH), гліцерокіназу (GK), десатуразу білка-носія стеароїлацилу (S-ACP-DES) і олеїл-ACP-гідролазу. У деяких конкретних варіантах здійснення ген може являти собою ортолог або гомолог цих генів у інших видів олієпродукуючих рослин.

У ще одному додатковому аспекті також надані злиті білки, що містить будь-який з ДНК-зв'язувальних доменів (наприклад, ZFP), що описуються в цьому документі. У певних варіантах здійснення злитий білок містить білок з цинковими пальцями і домен регуляції транскрипції (наприклад, домен активації або репресії), також відомий як ZFP TF. У інших варіантах здійснення злитий білок містить ZFP і нуклеазний домен з утворенням нуклеази з цинковими пальцями (ZFN), що розщеплює ген-мішень в області генома, яка представляє інтерес. У певних варіантах здійснення ZFN включає злитий поліпептид, що містить конструйований зв'язувальний домен цинкових пальців зі специфічністю до гена, залученого до шляху біосинтезу жирних кислот у рослин (наприклад, ген, що кодує ACCase, KAS I, KAS II, KAS III, KAS IV, FATB1, FATB2, FATB3, FATB4, FATB5, FAS, FAE1, FatA, Fad2, Fad3, GPDH, GK або S-ACP-DES), і домен розщеплення, і/або один або декілька злитих поліпептидів, що містить конструйований зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення. У певних варіантах здійснення зв'язувальні домени цинкових пальців зв'язуються з ділянкою-мішенню, як показано в таблиці 2 або таблиці 10A. У певних варіантах здійснення зв'язувальні домени цинкових пальців містять послідовність, вибрану з групи, яка складається з білків з цинковими пальцями, що містить домени розпізнавання (наприклад, одиничного ланцюга), представлені в таблиці 1 або таблиці 10B. Домени розщеплення і напівдомени розщеплення можна отримувати, наприклад, з різних рестрикційних ендонуклеаз і/або хомінг-ендонуклеаз. У одному з варіантів здійснення напівдомени розщеплення отримують з рестрикційної ендонуклеази типу IIS (наприклад, FokI).

У інших аспектах в цьому документі надані поліпептиди, які кодують будь-який з ДНК-зв'язувальних доменів (наприклад, білки з цинковими пальцями) і/або злиті білки, що описуються в цьому документі. Певні варіанти здійснення, що описуються в цьому документі, являє собою експресуючий ZFP вектор, що містить поліпептид, який кодує один або декілька ZFP, що описуються в цьому документі, функціонально зв'язані з промотором. У одному з варіантів здійснення один або декілька з ZFP являють собою ZFN.

ZFP і злиті білки, що містить ці ZFP, можуть зв'язуватися з геном, залученим до синтезу жирних кислот, і/або розщеплювати його в кодуючій області гена або в некодуючій послідовності в гені або поруч з ним, такий як, наприклад, лідерна послідовність, трейлерна послідовність або інтрон, або в нетранскрибованій області, вище або нижче кодуючої області. У певних варіантах здійснення ZFP або ZFN зв'язуються з кодуючою послідовністю або регуляторною послідовністю гена, залученого до біосинтезу жирних кислот, і/або розщеплюють їх.

У іншому аспекті в цьому документі описані композиції, що містить один або декілька білків, злитих білків або поліпептидів, як описано в цьому документі. Рослинні клітини можуть містити один унікальний ген-мішень або декілька паралогічних піків одного і того ж гена. Таким чином, композиції можуть містити один або декілька білків, які містять ZFP (і поліпептидів, що кодують їх), направлених на один або декілька генів, залучених до синтезу жирних кислот в рослинній клітині. ZFP можуть бути направленими до всіх паралогічних або гомеологічних генів і конкретних вибраних паралогічних або гомеологічних генів в рослинній клітині або їх сполучення.

У іншому аспекті в цьому документі надана рослинна клітина-хазяїн, що містить один або декілька білків або полінуклеотидів (наприклад, експресуючі ZFP вектори), як описано в цьому документі. Для полінуклеотидів, рослинна клітина-хазяїн може бути стабільно трансформованою або транзитивно трансфікованою або бути підданою їх сполученню одним або декількома експресуючими ZFP векторами. У одному з варіантів здійснення один або декілька експресуючих ZFP векторів експресують в рослинній клітині-хазяїні одну або декілька ZFN. У іншому варіанті здійснення один або декілька експресуючих ZFP векторів експресують в рослинній клітині-хазяїні один або декілька ZFP TF.

У іншому аспекті в цьому документі описаний спосіб модуляції експресії одного або декількох генів, залучених до біосинтезу жирних кислот в рослинній клітині, де спосіб включає: (а) введення в рослинну клітину одного або декількох експресуючих векторів, що кодують один або декілька ZFP TF, які зв'язуються з ділянкою-мішенню в одному або декількох генах, залучених до біосинтезу жирних кислот, в таких умовах, що відбувається експресія ZFP TF і модуляція одного або декількох генів. Модуляція може являти собою активацію або репресію. У певних варіантах здійснення щонайменше один ділянка-мішень знаходиться в гені(ах) ACCази, KAS I, KAS II, KAS III, KAS IV, FATB1, FATB2, FATB3, FATB4, FATB5, FAS, FAE1, FatA, Fad2, Fad3, GPDH, GK і/або S-ACP-DES. У інших варіантах здійснення відбувається модуляція більше одного гена, залученого до біосинтезу жирних кислот. У будь-якому зі способів модуляції експресії генів, залучених до біосинтезу жирних кислот, як описано в цьому документі, цими способами отримують рослинні клітини з модифікованим вмістом жирних кислот, наприклад, зі зниженням кількості насичених жирних кислот в рослинних клітинах. У деяких варіантах здійснення модифікований вміст жирних кислот в рослинних клітинах приводить до модифікованого вмісту жирних кислот в насінні рослини, наприклад, до зниження кількості насичених жирних кислот в насінні рослини. У деяких варіантах здійснення рослина являє собою олієпродукуючу рослину з модифікованим вмістом жирних кислот в насінні олієпродукуючої рослини (наприклад, зі зниженим вмістом насичених жирних кислот). У певному конкретному варіанті здійснення рослина являє собою рослину *Brassica napus* з модифікованим вмістом жирних кислот в насінні рослини *Brassica napus* (наприклад, зі зниженим вмістом насичених жирних кислот).

У іншому аспекті в цьому документі описаний спосіб розщеплення одного або декількох генів, залучених до біосинтезу жирних кислот в рослинній клітині, де спосіб включає: (а) введення в рослинну клітину одного або декількох експресуючих векторів, що кодують одну або декілька нуклеаз (наприклад, ZFN), які зв'язуються з ділянкою-мішенню в одному або декількох генах, залучених до біосинтезу жирних кислот, в таких умовах, що відбувається експресія нуклеаз(и) (наприклад, ZFN) і розщеплення одного або декількох генів. У певних варіантах здійснення щонайменше одна ділянка-мішень знаходиться в гені, що кодує ACCазу, KAS I, KAS II, KAS III, KAS IV, FATB1, FATB2, FATB3, FATB4, FATB5, FAS, FAE1, FatA, Fad2, Fad3, GPDH, GK і/або S-ACP-DES. У інших варіантах здійснення розщеплюється більше одного гена, залученого до біосинтезу жирних кислот. Крім того, в будь-якому зі способів, що описуються в цьому документі, розщеплення одного або декількох генів повинно приводити до делеції, додавання і/або заміни нуклеотидів в розщеплюваній області.

У ще одному аспекті в цьому документі описаний спосіб введення в геном рослинної клітини екзогенної послідовності, де спосіб включає стадії: (а) приведення клітини в контакт з екзогенною послідовністю (донорний вектор) і (б) експресію в клітині однієї або декількох нуклеаз (наприклад, нуклеаз з цинковими пальцями), як описано в цьому документі, де одна або декілька нуклеаз розщеплюють хромосому ДНК так, що розщеплення хромосомної ДНК на етапі (б) стимулює вбудовування донорного вектора в геном за допомогою гомологічної рекомбінації. У певних варіантах здійснення одна або декілька нуклеаз являють собою злиття домену розщеплення рестрикційної ендонуклеази типу IIs і сконструйованого зв'язувального домену цинкових пальців. У інших варіантах здійснення нуклеаза містить хомінг-ендонуклеазу, наприклад, хомінг-ендонуклеазу з модифікованим ДНК-зв'язувальним доменом. У будь-якому зі способів, що описуються в цьому документі, екзогенна послідовність може кодувати білковий продукт.

У ще одному додатковому аспекті також надана трансгенна або нетрансгенна рослинна клітина, що отримується будь-яким зі способів, описаних в цьому документі.

У іншому аспекті в цьому документі надана рослина, що містить трансгенну або нетрансгенну рослинну клітину, отриману, як описано в цьому документі.

У іншому аспекті в цьому документі надане насіння рослини, що містить трансгенну або нетрансгенну рослинну клітину, отриману, як описано в цьому документі.

У іншому аспекті в цьому документі надана олія з насіння, що отримується з рослини, що містить трансгенну або нетрансгенну рослинну клітину, отриману, як описано в цьому документі.

Короткий опис креслень

5 Фігура 1 являє собою схематичне зображення шляхів біосинтез жирних кислот в канолі (*B. napus*). Воно адаптоване по John Shanklin, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY (Thelen and Ohlrogge, 2002, Metabolic engineering 4:12-21).

Фігура 2 являє собою схематичне зображення положень ділянок-мішеней в гені KASII для різних ілюстративних напрямлених на KASII ZFP TF. Числа означають ділянки-мішені ZFP, що містяться в конструкціях, приведених в таблиці III. Склади ZFP приведені в таблицях I і II.

10 Фігура 3 являє собою зображення експресії мРНК KASII в листі рослин T_0 , трансформованому активуючою KASII конструкцією ZFP TF 4695, як визначено за допомогою кПЛР-РЧ, у вигляді діаграми. Для розрахунку кратності зростання експресії, представленої на діаграмі, застосовували середнє по 27 контрольних рослинах. У певних випадках спостерігали більш ніж 3-и кратне зростання експресії мРНК KASII.

15 Фігура 4 являє собою зображення відношень експресії KASII-ZFP TF/тубуліну в листі рослин T_1 , детектованій кПЛР-РЧ, у вигляді діаграми. Порівнювали три випадки разом з відповідними нульовими значеннями.

20 Фігура 5 являє собою зображення у вигляді діаграми середніх відношень експресії мРНК KASII/тубуліну в TF, які містять ZFP, і сегрегуючих нуль-рослин T_1 , кожної з трьох подій, як визначено за допомогою кПЛР-РЧ. У листя цих рослин T_1 спостерігали 2-3-кратне підвищення експресії мРНК KASII.

25 Фігури 6A і 6B являють собою діаграми, отримані із застосуванням статистичного програмного забезпечення JMP для однофакторного аналізу жирних кислот(и)-мішеней, що демонструють узгоджене і значне ($p < 0,001$) зниження всіх C16 (6A) і зниження відношень всіх C16/всіх C18 (6B) в позитивних по ZFP TF рослин і сестринських нуль-рослин в кожному випадку. Всі C16 включали вміст C16:0 і C16:1, а всі C18 включали вміст C18:0, 18:1, 18:2 і 18:3.

На фігурі 7 приведено вирівнювання послідовностей AF318307 і AF244520. Затінення означає області точної гомології.

30 На фігурі 8 приведено вирівнювання послідовностей SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:30, AC 189461 і BH723504. Пунктирними лініями над відповідною послідовністю виділені послідовності прямого і зворотного праймерів (SEQ ID NO:28 і 29) для ампліфікації кДНК β -кетацил-АСР-синтетази II. Затінення означає області точної гомології.

35 На фігурі 9 зображена експресія генів FatB4 і FatB5 в трансгенних лініях калюсів *B. napus* для різних складів ZFP TF, присутніх в конструкціях pDAB4690-pDAB4692. Аналізували 17 ліній для контролю і 25 ліній для кожної з конструкцій ZFP. Чорні стовпці = експресія мРНК FatB4; сірі стовпці = експресія мРНК FatB5.

40 На фігурі 10 представлені експресії FatB4 і FatB5 в листі трансгенних рослин T_0 *B. napus*, які аналізуються з використанням кПЛР-РЧ. У трансгенних рослинах тестували три конструкції, що містять ZFP TF, pDAB4689-pDAB4691. Загальна кількість незалежних трансгенних рослин T_1 , що аналізуються в цьому експерименті, становила 40, 62, 41 і 22 для pDAB4689-pDAB4691 і pDAB8210. відповідно. Контроль Nex710 складався з 10 рослин. Позитивними по експресії ZFP TF були дев'яносто сім процентів випадків перенесення трансгена для 3 конструкцій ZFP TF, як визначено за допомогою аналізу експресії ZFP TF (приклад 8.3). Подібні результати отримували, коли за допомогою еталона для нормалізації експресії генів FatB використовували експресію мРНК природного тубуліну. Чорний стовпець = експресія FatB4; сірий стовпець = експресія FatB5.

45 Фігура 11 являє собою діаграму, що демонструє лінійну залежність між експресією генів FatB і тубуліну при аналізі рослин T_1 . Чорні квадрати = експресія FatB4; сірі ромби = експресія FatB5.

50 На фігурі 12 представлена кПЛР-РЧ для експресії FatB4 і FatB5 в листі рослин T_1 , трансгенних по конструкції ZFP TF pDAB4691. Чорні квадрати = експресія FatB4; сірі ромби = експресія FatB5.

Фігура 13 являє собою однофакторний аналіз вмісту C18:0 на зразок з використанням статистичного програмного забезпечення JMP.

55 На фігурі 14 представлений однофакторний аналіз загального вмісту C16/C18 на зразок з використанням програмного забезпечення для статистичного аналізу JMP.

На фігурі 15 представлений аналіз профілів FA T_1 зрілого насіння, що містить 4 випадки з конструкціями ZFP TF, продемонстрований з використанням статистичного програмного забезпечення JMP. На панелях A і B представлений однофакторний аналіз вмісту C18:0 і вмісту C16:0/C18:0 на зразок (конструкцію), відповідно.

На фігурі 16 представлений аналіз профілів FA T₁ зрілого насіння, що містить 4 випадки з конструкціями ZFP TF, продемонстрований з використанням статистичного програмного забезпечення JMP. На панелях А і В представлений однофакторний аналіз вмісту C14:0 і вмісту C16:1 на зразок (конструкцію), відповідно, що підкреслює диференціюючу властивість конструкції pDAS5227. Аналіз профілів FA T₁ зрілого насіння, що містить 4 випадки з конструкціями ZFP TF, продемонстрований з використанням статистичного програмного забезпечення JMP. На панелях А і В представлений однофакторний аналіз вмісту C14:0 і C16:1 на зразок (конструкцію), відповідно, що підкреслює диференціюючу властивість конструкції pDAS5227.

На фігурі 17 продемонстроване зниження експресії мРНК FatB5 (чорні стовпці) в незрілому насінні T₂, трансформованому конструкцією з ZFP TF pDAS5227. Експресія ZFP TF представлена експресією ERF3 (сірі стовпці). Аналізували незріле насіння на 25 DAF з чотирьох нуль-рослин, трьох гетерозиготних (5227_12ZF-1) і чотирьох гомозиготних (5227_12ZF-2) рослин T₁ у випадку 5227-12.

На фігурі 18 представлене зниження експресії мРНК FatB5 (чорні стовпці) в незрілому насінні T₂, трансформованому конструкцією з ZFP TF pDAS5212. Експресія мРНК ZFP TF представлена експресією KRAB1 (сірі стовпці). Аналізували незріле насіння на 25 DAF з п'яти нуль-рослин, трьох гетерозиготних і чотирьох гомозиготних рослин у випадку 5212-4.

На фігурі 19 представлений однофакторний аналіз всіх насичених жирних кислот (насич.) відповідно до зиготності насіння T₂ у випадку 5227-12 з ZFP TF. Насіння T₂, отримане з нуль-рослин, гетерозиготних і гомозиготних вихідних рослин T₁, позначали як 5227-12ZF нуль, 5227-12ZF(1) і 5227-12ZF(2), відповідно.

На фігурі 20 представлений однофакторний аналіз всіх насичених жирних кислот (насич.) відповідно до зиготності насіння T₂ у випадку 5227-4 з ZFP TF. Насіння T₂, отримане з рослин негативного контролю, гетерозиготних і гомозиготних вихідних рослин T₁, позначали як 5227-4ZF нуль, 5227-4ZF(1) і 5227-4ZF(2), відповідно.

Докладний опис

У даному документі описані композиції і способи, придатні для модуляції експресії і направлено розщеплення і зміни однієї або декількох генів, залученого до синтезу жирних кислот у рослин. Регуляцію таких генів можна модулювати, наприклад, використовуючи конструйовані фактори транскрипції з ZFP або модифікуючи регуляторні області гена. Гени можна змінювати, наприклад, за допомогою направлено розщеплення з подальшою внутрішньохромосомною гомологічною рекомбінацією або за допомогою направлено розщеплення з подальшою гомологічною рекомбінацією між екзогенним полінуклеотидом (що містить одну або декілька областей гомології з нуклеотидною послідовністю гена) і геномною послідовністю.

Геномні послідовності включають послідовності, присутні в хромосомах, епісомах, геномах органел (наприклад, мітохондрій, пластид), штучних хромосомах і нуклеїновій кислоті будь-якого іншого типу, присутні в клітині, наприклад, такі як ампліфіковані послідовності, подвійні мікрохромосоми і геноми ендогенних або інфікуючих бактерій і вірусів. Геномні послідовності можуть бути нормальними (тобто, дикого типу) або мутантними; мутантні послідовності можуть містити, наприклад, вставлення, делеції, транслокації, перестановки і/або точкові мутації. Геномна послідовність також може містити один з ряду різних алелів.

Композиції, що описуються в цьому документі, містять один або декілька ZFP, що містять конструйовані зв'язувальні домени цинкових пальців, полінуклеотиди, що кодують ці поліпептиди і комбінації ZFP і кодуючі ZFP полінуклеотидів. Зв'язувальний домен цинкових пальців може містити один або декілька цинкових пальців (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше цинкових пальців), і його можна конструювати для зв'язування з будь-якою геномною послідовністю гена, включаючи регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з геном, залученим до біосинтезу жирних кислот.

Як описано в цьому документі, ZFP можна використовувати для регуляції експресії гена за допомогою активації або репресії транскрипції гена. Можна конструювати ZFP, що містить злиття доменів цинкових пальців, зв'язаних з регуляторними доменами, з отриманням химерних факторів транскрипції, що активують або що репресують транскрипцію. ZFP також можна використовувати для направлено розщеплення області геному, яка представляє інтерес, за допомогою зв'язування доменів цинкових пальців з доменами розщеплення нуклеаз (або напівдоменами розщеплення) з отриманням нуклеаз з цинковими пальцями. Таким чином, при ідентифікації області-мішені генома, яка представляє інтерес, для якої бажані регуляція, розщеплення або рекомбінація гена, способами, що описуються в цьому документі, можна конструювати білок з цинковими пальцями, що містить один або декілька злитих білків, що

містить один або декілька регуляторних доменів і/або доменів розщеплення (або напівдоменів розщеплення), зв'язаних з доменом цинкових пальців, сконструйованим для розпізнавання генної послідовності в цій геномній області. Присутність такого злитого білка (або білків), який (які) містить(ять) ZFP, в клітині приводить до зв'язування злитого білка(ів) з його (їх) ділянкою(ами) зв'язування і змінює регуляцію або розщеплення геномної області або області поруч з нею. Крім того, якщо розщеплюють геномну область і в клітині також присутній екзогенний полінуклеотид, гомологічний цій геномній області, між геномною областю і екзогенним полінуклеотидом з високою імовірністю відбувається гомологічна рекомбінація.

Як показано на фігурі 1, існує декілька генів, залучених до біосинтезу жирних кислот. Таким чином, композиції, що описуються в цьому документі, можуть бути направленими на один або декілька з цих генів в рослинній клітині, включаючи як необмежувальних приклади генів(а) ACCази, KAS I, KAS II, KAS III, KAS IV, FATB1, FATB2, FATB3, FATB4, FATB5, FAS, FAE1, FatA, Fad2, Fad3, GPDH, GK або S-ACP-DES і ортологи, паралоги і гомеологи цих генів. Наприклад, білки (наприклад, ZFP), що описуються в цьому документі, можуть бути направленими на 1, 2, 3, 4, 5 або більше генів, залучених до біосинтезу жирних кислот. Таким чином, для направлення на бажані гени, які представляють інтерес, в рослині можна комбінувати один або декілька ZFP або експресуючих векторів, що кодують ZFP, різної специфічності.

Загальна частина

Якщо не указано інакше, при практичному застосуванні способів, а також при отриманні і застосуванні композицій, які описуються в цьому документі, використовують загальноприйняті способи в галузях молекулярної біології, біохімії, структури і аналізу хроматину, обчислювальної хімії, культивування клітин, рекомбінантних ДНК і пов'язаних областях, як відомо фахівцям в даній галузі. Ці способи повністю описані в літературі. Див., наприклад, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A.P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; i METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Визначення

Терміни "нуклеїнова кислота", "полінуклеотид" і "олігонуклеотид" використовують взаємозамінно, і вони стосуються дезоксирибонуклеотидного або рибонуклеотидного полімеру, в лінійній або кільцевій конформації, і в одно- або дволанцюжковій формі. Для цілей даного опису ці терміни не треба розглядати як обмежуючі відносно довжини полімеру. Терміни можуть включати відомі аналоги природних нуклеотидів, а також нуклеотиди, які модифіковані по групах основи, цукру і/або фосфату (наприклад, тіофосфатні каркаси). Як правило, аналог конкретного нуклеотиду має ту ж специфічність спарювання основ; наприклад аналог А утворює пару основ з Т.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовують взаємозамінно для позначення полімеру з амінокислотних залишків. Термін також використовують для полімерів з амінокислот, в яких одна або декілька амінокислот являють собою хімічні аналоги або модифіковані похідні відповідних природних амінокислот.

"Зв'язування" стосується специфічної для послідовності нековалентної взаємодії між макромолекулами (наприклад, між білком і нуклеїновою кислотою). Не всі компоненти зв'язувальної взаємодії повинні бути специфічними для послідовності (наприклад, контакти з фосфатними залишками в каркасі ДНК), за умови, що загалом взаємодія є специфічною для послідовності. Такі взаємодії, як правило, характеризуються константою дисоціації (K_d) 10^{-6} М⁻¹ або нижче. "Афінність" стосується сили зв'язування: більш висока афінність зв'язування корелює з меншою K_d .

"Зв'язувальний білок" являє собою білок, здатний нековалентно зв'язуватися з іншою молекулою. Зв'язувальний білок може зв'язуватися, наприклад, з молекулою ДНК (ДНК-зв'язувальний білок), молекулою РНК (РНК-зв'язувальний білок) і/або молекулою білка (білок-зв'язувальний білок). У разі білок-зв'язувального білка, він може зв'язуватися сам з собою (з формуванням гомодимерів, гомотримерів і т. д.), і/або він може зв'язуватися з однією або декількома молекулами іншого білка або білків. Зв'язувальний білок може мати більше, ніж один тип зв'язувальної активності. Наприклад, білки з цинковими пальцями мають ДНК-зв'язувальну, РНК-зв'язувальну і білок-зв'язувальну активність.

"ДНК-зв'язувальний білок з цинковими пальцями" (або зв'язувальний домен) являє собою білок або домен в більш великому білку, який зв'язує ДНК специфічним для послідовності чином за допомогою одного або декількох цинкових пальців, які являють собою області амінокислотної послідовності в зв'язувальному домені, структура яких стабілізована за допомогою координативної взаємодії з іоном цинку. Термін ДНК-зв'язувальний білок з цинковими пальцями часто скорочують як білок з цинковими пальцями або ZFP.

Зв'язувальні домени цинкових пальців можуть бути "конструйованими" для зв'язування з попередньо визначеною нуклеотидною послідовністю (наприклад, послідовністю-мішенню в будь-якому гені, залученому до біосинтезу жирних кислот). Необмежувальні приклади способів конструювання білків з цинковими пальцями являють собою складання і відбір. Складений білок з цинковими пальцями являє собою білок, що не зустрічається в природі, склад/композиція якого в основному є результатом раціональних критеріїв. Раціональні критерії складання включають застосування правил заміни і комп'ютеризованих алгоритмів для обробки інформації в базі даних, що зберігає інформацію про існуючі конструкції ZFP і дані зв'язування. Див., наприклад, патенти США 6140081; 6453242; 6534261 і 6785613; також див. WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 і WO 03/016496 і патенти США 6746838; 6866997 і 7030215. Таким чином, "конструйований" білок з цинковими пальцями або "неприродний" білок з цинковими пальцями являє собою білок, в якому один або декілька компонентів ДНК-зв'язувальних доменів цинкових пальців (розпізнавальних спіралей) є неприродними і сконструйовані для зв'язування із заздалегідь вибраною ділянкою-мішенню.

"Відібраний" білок з цинковими пальцями являє собою білок, що не зустрічається в природі, отримання якого переважно є результатом емпіричного способу, такого як фаговий дисплей, уловлювання взаємодій або відбір гібридів. Див. наприклад, US 5789538; US 5925523; US 6007988; US 6013453; US 6200759; US 6733970; US RE39229 і WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197 і WO 02/099084.

Термін "послідовність" стосується нуклеотидної послідовності будь-якої довжини, яка може являти собою ДНК або РНК; може бути лінійною, кільцевою або розгалуженою і може бути одноланцюжковою або дволанцюжковою. Термін "донорна послідовність" стосується нуклеотидної послідовності, яка вставлена в геном. Донорна послідовність може мати будь-яку довжину, наприклад довжину від 2 до 25000 нуклеотидів (або будь-яке цілочисельне значення між ними або більшим), переважно - довжиною приблизно від 100 до 5000 нуклеотидів (або будь-яким цілочисельним значенням між ними), більш переважно - довжиною приблизно від 200 до 2500 нуклеотидів.

"Гомологічна послідовність" стосується першої послідовності, яка має певний ступінь ідентичності послідовностей з другою послідовністю, і послідовність якої може бути ідентична послідовності другої послідовності. "Гомологічна неідентична послідовність" стосується першої послідовності, яка має певний ступінь ідентичності послідовностей з другою послідовністю, але послідовність якої не є ідентичною послідовності другої послідовності. Наприклад, полінуклеотид, що містить послідовність дикого типу мутантного гена, гомологічний і неідентичний послідовності мутантного гена. У певних варіантах здійснення ступінь гомології між двома послідовностями є достатнім для забезпечення гомологічної рекомбінації між ними з використанням нормальних клітинних механізмів. Довжина двох гомологічних неідентичних послідовностей може бути будь-якою, а їх ступінь негомологічності може бути настільки малою, як одиничний нуклеотид (наприклад, для корекції точкової геномної мутації за допомогою гомологічної рекомбінації) або настільки великий, як 10 або більше тисячі пар основ (наприклад, для вставляння гена в попередньо визначену ділянку хромосоми). Довжина двох полінуклеотидів, що містить гомологічні неідентичні послідовності, не повинна бути однаковою. Наприклад, можна використовувати екзогенний полінуклеотид (тобто, донорний полінуклеотид) довжиною від 20 до 10000 нуклеотидів або пар нуклеотидів.

Способи визначення ідентичності нуклеїнових кислот і амінокислотних послідовностей відомі в даній галузі. Як правило, такі способи включають визначення нуклеотидної послідовності мРНК гена і/або визначення амінокислотної послідовності, що кодується нею, і порівняння цих послідовностей з другою нуклеотидною або амінокислотною послідовністю. Геномні послідовності також можна визначати і порівнювати таким способом. У основному, ідентичність стосується точної відповідності нуклеотид-до-нуклеотиду або амінокислота-до-амінокислоти двох полінуклеотидних або поліпептидних послідовностей, відповідно. Дві або більше послідовності (полінуклеотидних або амінокислотних) можна порівнювати, визначаючи процент їх ідентичності. Процент ідентичності двох послідовностей, послідовностей нуклеїнової кислоти або амінокислотних послідовностей являє собою число точної відповідності між двома вирівняними послідовностями, розділене на довжину більш коротких послідовностей і

помножене на 100. Приблизне вирівнювання послідовностей нуклеїнової кислоти забезпечує алгоритм локальної гомології Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Цей алгоритм можна застосовувати для амінокислотних послідовностей, використовуючи оцінну матрицю, розроблену Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, і нормалізовану Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986). Ілюстративна реалізація цього алгоритму з визначенням процента ідентичності послідовностей надана Genetics Computer Group (Madison, WI) в практичному додатку "BestFit". Параметри за умовчанням для цього способу описані в керівництві Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (доступному в Genetics Computer Group, Madison, WI). Переважним способом визначення процента ідентичності в контексті даного опису є використання пакета програм MPSRCH, що належить University of Edinburgh, розробленого John F. Collins і Shane S. Sturrok і поширюваного IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). З цього сімейства пакетів можна використовувати алгоритм Сміта-Уотермана, де для оцінної таблиці використовують параметри за умовчанням (наприклад, штраф за створення пропуску 12, штраф за продовження пропуску - одиниця, і пропуск - шість). У отримуваних даних значення "співпадає" означає ідентичність послідовностей. У даній галузі відомі інші відповідні програми для розрахунку процента ідентичності або схожості між послідовностями, наприклад, іншою програмою вирівнювання є BLAST, що використовується з параметрами за умовчанням. Наприклад, можна використовувати BLASTN і BLASTP з використанням наступних параметрів за умовчанням: генетичний код=стандартний; фільтр=відсутній; ланцюг=обидва; поріг=60; очікування=10; матриця=BLOSUM62; описи=50 послідовностей; сортування=по найбільшому показнику; бази даних=невироджена, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+трансляція GenBank в CDS+Swiss protein+Spupdate+PIR. Подробиці про ці програми можна знайти в Інтернеті. Відносно послідовностей, що описуються в цьому документі, діапазон бажаних ступенів ідентичності послідовностей складає приблизно від 35 % до 100 % і будь-яке цілочисельне значення між ними. Як правило, процент ідентичності послідовностей складає щонайменше 35-40 %; 40-45 %; 45-50 %; 50-60 %; 60-70 %; 70-75 %, переважно 80-82 %, більш переважно 85-90 %, навіть більш переважно 92 %, ще більш переважно 95 %, а найбільш переважно 98 %.

Альтернативно, ступінь схожості послідовностей полінуклеотидів можна визначати за допомогою гібридизації полінуклеотидів в умовах, що допускають формування стабільних дуплексів між гомологічними областями, з подальшим розщепленням специфічною до одиночного ланцюга нуклеазою(ами) і визначенням розмірів розщеплених фрагментів. Дві послідовності нуклеїнових кислот або дві поліпептидних послідовності є значною мірою гомологічними одна одній, коли ідентичність послідовностей складає щонайменше приблизно 70-75 %, переважно 80-82 %, більш переважно 85-90 %, навіть більш переважно 92 %, ще більш переважно 95 %, а найбільш переважно 98 % в порівнянні з певною довжиною молекули, як визначають описаними вище способами. Як застосовують в цьому документі, значною мірою гомологічні також стосується послідовностей, що демонструють повну ідентичність з конкретною послідовністю ДНК або поліпептидною послідовністю. Послідовності ДНК, гомологічні значною мірою, можна ідентифікувати в експерименті гібридизації по Саузерну, наприклад, в жорстких умовах, як визначено для конкретної системи. Визначення відповідних умов гібридизації відоме фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, Sambrook et al., вище; *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editors B.D. Hames and S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press.

Селективну гібридизацію двох фрагментів нуклеїнової кислоти можна визначати, як зазначено нижче. Ступінь ідентичності послідовностей двох молекул нуклеїнової кислоти впливає на ефективність і силу подій гібридизації між такими молекулами. Частково ідентична послідовність нуклеїнової кислоти щонайменше частково інгібує гібридизацію повністю ідентичної послідовності з молекулою-мішенню. Інгібування гібридизації повністю ідентичної послідовності можна оцінювати з використанням аналізів гібридизації, які добре відомі в даній галузі (наприклад, саузерн-блот (ДНК), нозерн-блот (РНК), гібридизація в розчині або т. п., див. Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Такі аналізи можна проводити з використанням варіюючих ступенів селективності, наприклад, з використанням умов, що варіюють від низької до високої жорсткості. Якщо використовують умови низької жорсткості, відсутність неспецифічного зв'язування можна оцінювати з використанням вторинного зонда з відсутністю навіть часткового ступеня ідентичності послідовностей (наприклад, зонд менше ніж приблизно з 30 % ідентичності послідовності з молекулою-мішенню) так, що за відсутності подій неспецифічного зв'язування вторинний зонд не гібридизується з мішенню.

При використанні системи детекції на основі гібридизації вибирають зонд нуклеїнової кислоти, комплементарний еталонній послідовності нуклеїнової кислоти, а потім за допомогою підбору прийнятних умов зонд і еталонну послідовність селективно гібридизують або зв'язують одне з одним з формуванням дуплексної молекули. Молекула нуклеїнової кислоти, здатна до селективної гібридизації з еталонною послідовністю в помірно жорстких умовах гібридизації, як правило, гібридизується в умовах, що дозволяють детекцію послідовності-мішені нуклеїнової кислоти довжиною щонайменше приблизно 10-14 нуклеотидів щонайменше приблизно з 70 % ідентичністю послідовності з послідовністю вибраного зонда нуклеїнової кислоти. Жорсткі умови гібридизації, як правило, дозволяють детекцію послідовностей-мішеней нуклеїнової кислоти довжиною щонайменше приблизно 10-14 нуклеотидів з ідентичністю послідовності, більшою ніж приблизно 90-95 %, з послідовністю вибраного зонда нуклеїнової кислоти. Умови гібридизації, придатні для гібридизації зонда/еталонної послідовності, де зонд і еталонна послідовність мають певний ступінь ідентичності послідовностей, можна визначати, як відомо в даній галузі (див., наприклад, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editors B.D. Hames and S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Умови гібридизації добре відомі фахівцям в даній галузі. Жорсткість гібридизації стосується ступеня, з яким умови гібридизації несприятливі для формування гібридів, що містить неспівпадаючі нуклеотиди, з більш високою жорсткістю, корелюючою з меншою допустимістю для неспівпадаючих гібридів. Фактори, що впливають на жорсткість гібридизації, добре відомі фахівцям в даній галузі і як необмежувальні приклади включають температуру, pH, іонну силу і концентрацію органічних розчинників, наприклад, таких як формамід і диметилсульфоксид. Як відомо фахівцям в даній галузі, жорсткість гібридизації зростає при підвищенні температури, зниженні іонної сили і зниженні концентрації розчинників.

Відносно жорсткості умов гібридизації в даній галузі добре відомо, що для встановлення конкретної жорсткості можна використовувати множину еквівалентних умов, наприклад, варіюючи наступні фактори: довжину і характер послідовностей, склад основ різних послідовностей, концентрації солей і інших компонентів розчину для гібридизації, присутність або відсутність в розчинах для гібридизації блокуючих засобів (наприклад, декстрансульфату і поліетиленгліколю), температуру реакції гібридизації і часові параметри, а також варіювання умов відмивання. Вибір конкретного набору умов гібридизації проводять відповідно до стандартних способів в даній галузі (див., наприклад, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

"Рекомбінація" стосується процесу обміну генетичною інформацією між двома полінуклеотидами. Для цілей даного опису "гомологічна рекомбінація (HR)" стосується спеціалізованої форми такого обміну, яка відбувається, наприклад, при відновленні подвійних розривів ланцюга в клітинах. Цей процес вимагає гомології нуклеотидних послідовностей, використовує "донорну" молекулу для відновлення матриці молекули-"мішені" (тобто, молекули, де стався подвійний розрив ланцюга) і під різними назвами відомий як "некросоверна генна конверсія" або "генна конверсія на коротких ділянках", оскільки він приводить до перенесення генетичної інформації від донора до мішені. Без бажання бути пов'язаним якою-небудь конкретною теорією, таке перенесення може залучати корекцію невідповідностей гетеродуплекса ДНК, що формується між розірваною мішенню і донором, і/або "залежний від синтезу відпал ланцюгів", в якому донор застосовують для відтворення генетичної інформації, яка стає частиною мішені і/або пов'язані процеси. Така спеціалізована HR часто приводить до зміни послідовності молекули-мішені так, що в полінуклеотид-мішень вбудовується частина або вся послідовність донорного полінуклеотиду.

"Розщеплення" стосується розриву ковалентного каркаса молекули ДНК. Розщеплення можна ініціювати множиною способів, включаючи як необмежувальні приклади ферментативний або хімічний гідроліз фосфодіефірного зв'язку. Можливо одноланцюжкове розщеплення і дволанцюжкове розщеплення, і дволанцюжкове розщеплення може відбуватися як результат двох окремих подій одноланцюжкового розщеплення. Розщеплення ДНК може приводити до утворення тупих кінців або липких кінців. У певних варіантах здійснення для направленої дволанцюжкового розщеплення ДНК використовують злиті поліпептиди.

"Домен розщеплення" містить одну або декілька поліпептидних послідовностей, які мають каталітичну активність відносно розщеплення ДНК. Домен розщеплення може міститися в одному поліпептидному ланцюгу, або розщеплювальна активність може бути результатом асоціації двох (або більше) поліпептидів.

"Напівдомен розщеплення" являє собою поліпептидну послідовність, яка в поєднанні з другим поліпептидом (ідентичним або відмінним) формує комплекс з розщеплювальною активністю (переважно активність розщеплення подвійного ланцюга).

"Хроматин" являє собою нуклеопротейнову структуру, що містить клітинний геном. Клітинний хроматин містить нуклеїнову кислоту, переважно ДНК, і білки, включаючи гістони і негістонові хромосомні білки. Більшість хроматину еукаріотичних клітин присутня у формі нуклеосом, де ядро нуклеосомі містить приблизно 150 пар основ ДНК, асоційованих з октамером, що містить

по два кожного з гістонів H2A, H2B, H3 і H4; і лінкерну ДНК (змінної довжини залежно від організму), розташовану між ядрами нуклеосом. Молекула гістону H, як правило, асоційована з лінкерною ДНК. Для цілей даного опису термін "хроматин" призначений для включення всіх типів клітинних нуклеопротейнів, прокаріотичних і еукаріотичних. Клітинний хроматин включає хромосомний і епісомний хроматин.

"Хромосома" являє собою хроматиновий комплекс, що містить весь геном клітини або його частину. Геном клітини часто характеризують за допомогою його каріотипу, що являє собою набір всіх хромосом, що містить геном клітини. Геном клітини може містити одну або декілька хромосом.

"Епісома" являє собою нуклеїнову кислоту, яка реплікується, нуклеопротейновий комплекс або іншу структуру, що містить нуклеїнову кислоту, що не є частиною хромосомного каріотипу клітини. Приклади епісом включають плазміді і певні вірусні геноми.

"Досяжна область" являє собою ділянку в клітинному хроматині, в якій ділянка-мішень, присутня в нуклеїновій кислоті, може бути зв'язана екзогенною молекулою, що розпізнає ділянку-мішень. Без бажання бути зв'язаним якою-небудь конкретною теорією, вважають, що досяжна область являє собою область, не упаковану в нуклеосомну структуру. Певну структуру досяжної області часто можна детектувати по її чутливості до хімічних і ферментативних зондів, наприклад, нуклеаз.

"Ділянка-мішень" або "послідовність-мішень" являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка визначає частину нуклеїнової кислоти, з якою зв'язується зв'язувальна молекула за умови наявності умов, достатніх для зв'язування. Наприклад, послідовність 5'-GAATTC-3' являє собою ділянку-мішень для рестрикційної ендонуклеази EcoRI.

"Екзогенна" молекула являє собою молекулу, яка в нормі не присутня в клітині, але яку можна вводити в клітину одним або декількома генетичними, біохімічними або іншими способами. "Присутність в клітині в нормі" визначають відносно конкретної стадії розвитку клітини і умов оточуючого її середовища. Таким чином, наприклад, молекула, яка присутня тільки при ембріологічному розвитку м'яза, являє собою екзогенну молекулу відносно дорослої м'язової клітини. Подібним чином, молекула, що індукується тепловим шоком, являє собою екзогенну молекулу відносно клітини поза тепловим шоком. Екзогенна молекула може містити, наприклад, функціонуючу версію неправильно функціонуючої ендогенної молекули або неправильно функціонуючу версію нормально функціонуючої ендогенної молекули.

Зокрема, екзогенна молекула може являти собою низькомолекулярну сполуку, таку як отримують способом комбінаторної хімії, або макромолекулу, таку як білок, нуклеїнова кислота, вуглевод, ліпід, глікопротеїн, ліпопротеїн, полісахарид і будь-яке модифіковане похідне вказаних вище молекул, або будь-який комплекс, що містить одну або декілька з вказаних вище молекул. Нуклеїнові кислоти включають ДНК і РНК, можуть бути одно- або дволанцюжковими; можуть бути лінійними, розгалуженими або кільцевими; і можуть мати будь-яку довжину. Нуклеїнові кислоти включають нуклеїнові кислоти, здатні до формування дуплексів, а також формуючі триплекси нуклеїнові кислоти. Див., наприклад, патенти США №№ 5176996 і 5422251. Білки як необмежувальні приклади включають ДНК-зв'язувальні білки, фактори транскрипції, фактори перебудови хроматину, білки, які зв'язують метиловану ДНК, полімерази, метилази, деметилази, ацетилази, деацетилази, кінази, фосфатази, інтегрази, рекомбінази, лігази, топоізомерази, гірази і геліази.

Екзогенна молекула може бути молекулою того ж типу, що і ендогенна молекула, наприклад, екзогенний білок або нуклеїнова кислота. Наприклад, екзогенна нуклеїнова кислота може включати інфікуючий вірусний геном, Т-ланцюг *Agrobacterium tumefaciens*, плазміді або епісому, що вводиться в клітину, або хромосому, яка в нормі не присутня в клітині. Способи введення екзогенних молекул в клітини відомі фахівцям в даній галузі і як необмежувальні приклади включають опосередковане ліпідами перенесення (тобто, ліпосоми, що містять нейтральні і катіонні ліпіди), електропорацію, пряму ін'єкцію, злиття клітин, бомбардування частинками, співосадження з фосфатом кальцію, опосередковане DEAE-декстраном перенесення і опосередковане вірусним вектором перенесення. Екзогенна молекула, що не є молекулою рослини, може являти собою, наприклад, антитіло ссавця (наприклад, людини або гуманізоване).

На відміну від цього, "ендогенна" молекула являє собою молекулу, яка в нормі присутня в конкретній клітині в конкретній стадії розвитку в конкретних умовах навколишнього середовища.

Наприклад, ендогенна нуклеїнова кислота може включати хромосоми, геном мітохондрії, хлоропласта або іншої органели або природну епісомну нуклеїнову кислоту. Додаткові ендогенні молекули можуть включати білки, наприклад, фактори транскрипції і ферменти.

"Злита" молекула являє собою молекулу, в якій зв'язані дві або більше молекулярні субодиниці, переважно ковалентно. Молекулярні субодиниці можуть бути молекулами однакового хімічного типу або можуть бути молекулами різних хімічних типів. Приклади зливої молекули першого типу як необмежувальні приклади включають злиті білки (наприклад, що містить ZFN злиття між ДНК-зв'язувальним доменом ZFP і доменом розщеплення) і злиті нуклеїнові кислоти (наприклад, нуклеїнова кислота, що кодує злитий білок, описаний вище). Приклади зливої молекули другого типу як необмежувальні приклади включають злиття між формуючою триплекс нуклеїновою кислотою і поліпептидом і злиття між засобом, який зв'язує малу борозенку, і нуклеїновою кислотою.

Експресія злитого білка в клітині може бути результатом доставки злитого білка в клітину або доставки в клітину полінуклеотиду, що кодує злитий білок, де полінуклеотид транскрибується і транскрипт транслюється з отриманням злитого білка. Також в експресію білка в клітині можуть бути залучені транссплайсинг, розщеплення поліпептидів і лігування поліпептидів. Способи доставки полінуклеотидів і поліпептидів в клітини надані в іншій частині цього опису.

"Ген" для цілей даного опису включає область ДНК, що кодує продукт гена (див. нижче), а також всі області ДНК, які регулюють отримання продукту гена, чи є такі регуляторні послідовності прилеглими до кодуєчих і/або транскрибованих послідовностей чи ні. Таким чином, ген включає, але не обов'язково обмежений ними, промоторні послідовності, термінатори, послідовності регуляції трансляції, такі як ділянки зв'язування рибосом і внутрішні ділянки зв'язування рибосом, ехансери, сайленсери, інсулятори, граничні елементи, ділянки початку реплікації, ділянки прикріплення до матриксу і області контролю локусів.

"Експресія гена" стосується перетворення інформації, що міститься в гені, в продукт гена. Продукт гена може являти собою безпосередній продукт транскрипції гена (наприклад, мРНК, тРНК, рРНК, антисмислова РНК, рибозим, кшРНК, мікро-РНК, структурна РНК або РНК будь-якого іншого типу) або білок, продукований за допомогою трансляції мРНК. Продукти генів також включають РНК, що модифікується такими процесами, як кепування, поліаденілування, метилування і редагування, і білки, які модифікуються, наприклад, метилуванням, ацетилюванням, фосфорилюванням, убіквітинілуванням, АДФ-рибозилілуванням, міристилуванням і глікозилюванням.

"Модуляція" експресії гена стосується зміни активності гена. Модуляція експресії як необмежувальні приклади може включати активацію генів і репресію генів.

"Рослинні" клітини як необмежувальні приклади включають клітини односім'ядольних (однодольних) або двосім'ядольних (дводольних) рослин. Необмежувальні приклади однодольних рослин включають злакові рослини, такі як кукурудза, рис, ячмінь, овес, пшениця, сорго, жито, цукрова тростина, ананас, цибуля, банан і кокос. Необмежувальні приклади дводольних рослин включають тютюн, помідор, соняшник, бавовну, цукровий буряк, картоплю, салат-латук, диню, сою, канолу (ріпак) і люцерну. Рослинні клітини можуть бути з будь-якої частини рослини і/або з будь-якої стадії розвитку рослини. Таким чином, рослинні клітини можуть являти собою клітини з насіння рослини. У деяких варіантах здійснення рослина або рослинна клітина являють собою рослину або походять з рослини, залученої до отримання рослинних олій для харчових і/або промислових видів застосування (тобто, "олієпродукуюча рослина"). Ілюстративні олієпродукуючі рослини як необмежувальні приклади включають види Brassica (наприклад, Brassica napus, що включає сорти канолі), кукурудзу, сою, катран, гірчицю, рициновий біб, арахіс, кунжут, бавовну, насіння льону, сафлор, олійну пальму, льон, соняшник і кокос.

"Областю, яка представляє інтерес" є будь-яка область клітинного хроматину, наприклад, така як ген або некодуюча послідовність в гені або прилягаюча до нього, з якою бажано зв'язувати екзогенну молекулу. Зв'язування можна проводити з метою направленої розщеплення ДНК і/або направленої рекомбінації. Область, яка представляє інтерес, може знаходитися, наприклад, в хромосомі, епісомі, геномі органели (наприклад, мітохондрії, хлоропласту) або в інфікуючому вірусному геномі. Область, яка представляє інтерес, може знаходитися в кодуєчій області гена, в транскрибованих некодуючих областях, наприклад, таких як лідерні послідовності, трейлерні послідовності або інтрони, або в нетранскрибованих областях, вище або нижче кодуєчої області. Довжина області, яка представляє інтерес, може бути настільки малою як одна нуклеотидна пара або може складати до 25000 пар нуклеотидів, або будь-яка цілочисельна кількість пар нуклеотидів.

Терміни "функціональний зв'язок" і "функціонально зв'язаний" використовують взаємозаміно відносно суміжного положення двох або більше компонентів (таких як елементи послідовності), в яких компоненти розташовані так, що обидва компоненти нормально функціонують і допускають можливість того, що щонайменше один з компонентів може опосередковувати функцію, що виконується щонайменше одним з інших компонентів. Як ілюстрація, послідовність регулятора транскрипції, така як промотор, функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю, якщо послідовність регулятора транскрипції контролює рівень транскрипції кодуючої послідовності у відповідь на присутність або відсутність одного або декількох факторів регуляції транскрипції. Послідовність регулятора транскрипції, як правило, функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю в цис-положенні, але не обов'язково безпосередньо межує з нею. Наприклад, енхансер являє собою послідовність регулятора транскрипції, який функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, навіть якщо вони не є суміжними.

Відносно злитих поліпептидів термін "функціонально зв'язаний" може стосуватися того факту, що кожний з компонентів виконує в зв'язку з іншим компонентом ту ж функцію, яку він би виконував, якби вони не були зв'язані. Наприклад, відносно злитого поліпептиду, в якому ДНК-зв'язувальний домен ZFP злитий з регуляторним доменом, ДНК-зв'язувальний домен ZFP і регуляторний домен знаходяться в функціональному зв'язку, якщо в злитому поліпептиді частина ДНК-зв'язувального домену ZFP здатна зв'язуватися зі своєю ділянкою-мішенню і/або своєю ділянкою зв'язування, тоді як регуляторний домен здатний регулювати експресію ДНК, знаходячись поблизу ділянки-мішені.

"Функціональний фрагмент" білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти являє собою білок, поліпептид або нуклеїнову кислоту, послідовність яких не ідентична повнорозмірному білку, поліпептиду або нуклеїновій кислоті, але при цьому зберігає ту ж функцію, що і повнорозмірний білок, поліпептид або нуклеїнова кислота. Функціональний фрагмент може містити більше, менше або ту ж кількість залишків, що і відповідна природна молекула, і/або може містити одну або декілька заміни амінокислот або нуклеотидів. Способи визначення функції нуклеїнових кислот (наприклад, кодуючої функції, здатності до гібридизації з іншою нуклеїновою кислотою) добре відомі в даній галузі. Подібним чином, добре відомі способи визначення функції білків. Наприклад, ДНК-зв'язувальну функцію поліпептиду можна визначати, наприклад, за допомогою зв'язування на фільтрі, зсуву електрофоретичної рухливості або аналізами імунопреципітації. Розщеплення ДНК можна аналізувати електрофорезом в гелі. Див. Ausubel et al., вище. Здатність білка взаємодіяти з іншим білком можна визначати, наприклад, за допомогою коімунопреципітації, двогібридних аналізів або комплементациєю, генетичною і біохімічною. Див., наприклад, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; патент США № 5585245 і PCT WO 98/44350.

Як застосовують в цьому документі, "насичені жирні кислоти" як необмежувальні приклади включають лауринову (C12:0), міристинову (C14:0), пальмітинову (C16:0) і стеаринову (C18:0) кислоти. Подібним чином, "мононенасичені жирні кислоти" і "поліненасичені жирні кислоти" як необмежувальні приклади включають жирні кислоти C18, такі як олеїнова кислота (C18:1), відновлена лінолева кислота (C18:2) і відновлена ліноленова кислота (C18:3).

Ділянки-мішені

Описувані способи і композиції включають злиті білки, що містить ДНК-зв'язувальний домен (наприклад, ZFP) і регуляторний домен або домен розщеплення (нуклеазний) (або напівдомен розщеплення), в яких ДНК-зв'язувальний домен (наприклад, домен цинкових пальців), зв'язуючись з послідовністю в клітинному хроматині в гені, залученому до синтезу жирних кислот, направляє активність домену регуляції транскрипції або домену розщеплення (або напівдомену розщеплення) поблизу з послідовністю і, таким чином, модулює транскрипцію або індукуює розщеплення поблизу з послідовністю-мішенню.

Як указано в іншій частині цього опису, домен цинкових пальців можна конструювати для зв'язування практично з будь-якою бажаною послідовністю. Таким чином, після ідентифікації області, яка представляє інтерес, що містить послідовність, в якій бажана регуляція, розщеплення або рекомбінація, можна конструювати один або декілька зв'язувальних доменів цинкових пальців зі зв'язуванням однієї або декількох послідовностей в області, яка представляє інтерес.

Вибір ділянки-мішені в області генома, яка представляє інтерес, в клітинному хроматині будь-якого гена, залученого до біосинтезу жирних кислот (наприклад, див. фігуру 1), для зв'язування доменом цинкових пальців (наприклад, ділянка-мішені), можна проводити, наприклад, способами, описаними в патенті, що належить тим же заявникам США № 6453242 (17 вересня 2002), в якому також описані способи складання ZFP для зв'язування з вибраною послідовністю. Фахівцям в даній галузі повинне бути зрозумілим, що для вибору ділянки-мішені

також можна використовувати простий візуальний огляд нуклеотидної послідовності. Таким чином, в способах, що заявляються, можна використовувати будь-які засоби вибору ділянки-мішені.

У певних варіантах здійснення ZFP, як описано в цьому документі, зв'язуються з ділянкою-мішенню в гені, що кодує ACCазу, KAS I, KAS II, KAS III, KAS IV, FATB1, FATB2, FATB3, FATB4, FATB5, FAS, FAE1, FatA, Fad2, Fad3, GPDH, GK i/або S-ACP-DES.

Ділянки-мішені, як правило, складаються з множини суміжних підділянок-мішеней. Підділянка-мішень стосується послідовності (як правило, триплету нуклеотидів або квадруплету нуклеотидів, який може перекриватися по одному нуклеотиду із суміжним квадруплетом), що зв'язується окремим цинковим пальцем. Див., наприклад, WO 02/077227. Якщо ланцюг, з яким білок з цинковими пальцями утворює більшість контактів, позначити як ланцюг-мішень, "ланцюг первинного розпізнавання" або "ланцюг первинного контакту", деякі білки з цинковими пальцями зв'язуються з триплетом з трьох основ в ланцюгу-мішені і з четвертою основою не на ланцюгу-мішені. Як правило, довжина ділянки-мішені складає щонайменше 9 нуклеотидів, і, таким чином, вона зв'язана зв'язувальним доменом цинкових пальців, що містить щонайменше три цинкові пальці. Однак також можливе зв'язування, наприклад, зв'язувального домену з 4 пальцями з ділянкою-мішенню з 12 нуклеотидів, зв'язувального домену з 5 пальцями з ділянкою-мішенню з 15 нуклеотидів або зв'язувального домену з 6 пальцями з ділянкою-мішенню з 18 нуклеотидів. Очевидно, що також можливе зв'язування більш великих зв'язувальних доменів (наприклад, з 7, 8, 9 і більше пальцями) з більш протяжними ділянками-мішенями.

Для ділянки-мішені необов'язково бути кратною трьом нуклеотидам. Наприклад, у випадках, в яких відбувається взаємодія з перехрещенням ланцюгів (див., наприклад, патент США 6453242 і WO 02/077227), один або декілька окремих цинкових пальців зв'язувального домену з декількома пальцями може зв'язуватися з квадруплетними підділянками, що перекриваються. Як результат, білок з трьома пальцями може зв'язувати послідовність з 10 нуклеотидів, де десятий нуклеотид є частиною квадруплету, зв'язаного з кінцевим пальцем, білок з чотирма пальцями може зв'язувати послідовність з 13 нуклеотидів, де тринадцятий нуклеотид є частиною квадруплету, зв'язаного з кінцевим пальцем, і т. д.

Також на зв'язування з послідовністю-мішенню впливає довжина і характер амінокислотних лінкерних послідовностей між окремими цинковими пальцями в зв'язувальному домені з декількома пальцями. Наприклад, присутність так званого "неканонічного лінкера", "довгого лінкера" або "структурованого лінкера" між сусідніми цинковими пальцями в зв'язувальному домені з декількома пальцями може забезпечувати зв'язок цих пальців з підділянками, які не прилягають одна до одної безпосередньо. Необмежувальні приклади таких лінкерів описані, наприклад, в патенті США № 6479626 і WO 01/53480. Таким чином, одна або декілька підділянок, в ділянки-мішені для зв'язувального домену цинкових пальців, можуть бути відділені одна від одної 1, 2, 3, 4, 5 або більше нуклеотидами. Надаючи усього один приклад, зв'язувальний домен з чотирма пальцями може зв'язувати ділянку-мішень з 13 нуклеотидів, що містять, послідовно, дві суміжні підділянки з 3 нуклеотидів, проміжний нуклеотид і дві суміжні триплетні підділянки. Також див. заявку США № 61/130099 для композицій і способів для зв'язування штучних нуклеаз для зв'язування з ділянками-мішенями, розділеними різною кількістю нуклеотидів. Відстань між послідовностями (наприклад, ділянками-мішенями) стосується кількості нуклеотидів або пар нуклеотидів, що знаходяться між двома послідовностями, як вимірюють від кінців послідовностей, найближчих один до одного.

У певних варіантах здійснення складають ZFP з функцією фактора транскрипції. Для функції як фактора транскрипції все, що в основному необхідно, це просте зв'язування і достатня близькість до промотору. Точне позиціонування відносно промотору, орієнтація і, в певних межах, дистанція не дуже важливі. Ця властивість забезпечує істотну гнучкість у виборі ділянок-мішеней для конструювання штучних факторів транскрипції. Таким чином, ділянка-мішень, розпізнавана ZFP, може являти собою будь-яку відповідну ділянку в гені-мішені, яка забезпечує активацію або репресію експресії гена ZFP, необов'язково зв'язаного з регуляторним доменом. Переважні ділянки-мішені включають області поряд, нижче або вище ділянки старту транскрипції. Крім того, ділянки-мішені можуть являти собою ділянки, розташовані в енхансерних областях, репресорних ділянках, ділянках зупинки РНК-полімерази і в особливих регуляторних ділянках (наприклад, ділянки SP-1, елементи відповіді на гіпоксію, елементи розпізнавання ядерного рецептора, ділянки зв'язування р53), ділянках в кодуєчій області кДНК або в кодуєчій області маркерної експресованої послідовності (EST).

У інших варіантах здійснення складають ZFP з нуклеазною активністю. Експресія злитого білка, який містить ZFN, що містить зв'язувальний домен цинкових пальців і домен розщеплення (або два злитих білки, де кожний містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен

розщеплення), в клітині приводить до розщеплення поблизу послідовності-мішені. У певних варіантах здійснення розщеплення залежить від зв'язування двох злитих молекул з доменами цинкових пальців/напівдоменами розщеплення з розділенням ділянок-мішеней. Дві ділянки-мішені можуть знаходитися на протилежних ланцюгах ДНК, або, альтернативно, обидві ділянки-мішені можуть знаходитися на одному ланцюгу ДНК.

ДНК-зв'язувальні домени

У практичному здійсненні даного винаходу можна використовувати будь-який ДНК-зв'язувальний домен. У певних варіантах здійснення ДНК-зв'язувальний домен містить зв'язувальний домен цинкових пальців з одним або декількома цинковими пальцями (Miller et al. (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes (1993) Scientific American Feb.:56-65; патент США № 6453242). Як правило, довжина одного домену цинкових пальців становить приблизно 30 амінокислот. Структурні дослідження продемонстрували, що кожний домен цинкових пальців (мотив) містить два бета-шари (що утримуються в положенні бета-вигину, що містить два інваріантних залишки цистеїну) і альфа-спіраль (що містить два інваріантних залишки гістидину), які утримуються в конкретній конформації за допомогою координаційних взаємодій двох цистеїнів і двох гістидинів з атомом цинку.

Цинкові пальці включають канонічні цинкові пальці C_2H_2 (тобто, цинкові пальці, в яких іон цинку координований двома залишками цистеїну і двома залишками гістидину) і неканонічні цинкові пальці, наприклад, такі як цинкові пальці C_3H і C_2HC (цинкові пальці, в яких іон цинку координований трьома залишками цистеїну і одним залишком гістидину, див., наприклад, патентну публікацію США № 2008/0182332) і цинкові пальці C_4 (цинкові пальці, в яких іон цинку координований чотирма залишками цистеїну). Також див. WO 02/057293.

Зв'язувальний домен цинкових пальців можна конструювати для зв'язування вибраної послідовності. Див., наприклад, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416. Конструйований (або неприродний) зв'язувальний домен цинкових пальців, в порівнянні з природним білком з цинковими пальцями може мати нову специфічність зв'язування. Способи конструювання як необмежувальні приклади включають, раціональне складання і різні типи відбору. Раціональне складання включає, наприклад, використання баз даних, що містить триплетні (або квадруплетні) нуклеотидні послідовності і конкретні амінокислотні послідовності цинкових пальців, в яких кожна триплетна або квадруплетна нуклеотидна послідовність асоційована з однією або декількома амінокислотними послідовностями цинкових пальців, які зв'язуються з конкретною триплетною або квадруплетною послідовністю. Див., наприклад, патенти США, що належать тим же заявникам 6453242 і 6534261. Додаткові способи складання описані, наприклад, в патентах США 6746838; 6785613; 6866997 і 7030215.

Ілюстративні способи відбору, включаючи фаговий дисплей і двогибридні системи, описані в патентах США 5789538; 5925523; 6007988; 6013453; 6410248; 6140466; 6200759 і 6242568; а також WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 і GB 2338237.

Збільшення специфічності зв'язування зв'язувальних доменів цинкових пальців описане, наприклад, в патенті, що належить тим же заявникам США № 6794136.

Оскільки окремий цинковий палець зв'язується з послідовністю з трьох нуклеотидів (тобто, триплетом) (або послідовністю з чотирьох нуклеотидів, яка може перекриватися по одному нуклеотиду з ділянкою зв'язування з чотирьох нуклеотидів сусіднього цинкового пальця), довжина послідовності, з якою повинен зв'язуватися конструйований зв'язувальний домен цинкових пальців (наприклад, послідовності-мішені), визначається кількістю цинкових пальців в конструйованому зв'язувальному домені цинкових пальців. Наприклад, для ZFP, в яких мотиви з пальцями не зв'язуються з підділянками, що перекриваються, послідовність-мішень з шести нуклеотидів зв'язана зв'язувальним доменом з двома пальцями; послідовність-мішень з дев'яти нуклеотидів зв'язана зв'язувальним доменом з трьома пальцями і т. д. Як указано в цьому документі, ділянки зв'язування для окремих цинкових пальців (тобто, підділянки) в ділянках-мішені не обов'язково повинні бути суміжними, але в залежності від довжини і характеру амінокислотних послідовностей між цинковими пальцями (тобто, лінкерів між пальцями) в зв'язувальному домені з декількома пальцями можуть бути розділені одним або декількома нуклеотидами.

У зв'язувальному домені цинкових пальців з декількома пальцями сусідні цинкові пальці можуть бути розділені амінокислотними лінкерними послідовностями приблизно з 5 амінокислот (так звані "канонічні" лінкери між пальцями) або, альтернативно, одним або декількома неканонічними лінкерами. Див., наприклад, патенти США №№, що належать тим же заявникам 6453242 і 6534261. Для конструйованих зв'язувальних доменів цинкових пальців, що містять

більше трьох пальців, переважною може бути вставка між певними цинковими пальцями більш довгих ("неканонічних") лінкерів між пальцями, оскільки вона може збільшити афінність і/або специфічність зв'язування зв'язувальним доменом. Див., наприклад, патент США № 6479626 і WO 01/53480. Таким чином, зв'язувальні домени цинкових пальців з декількома пальцями також можна характеризувати відносно присутності і положення неканонічних лінкерів між пальцями. Наприклад, зв'язувальний домен цинкових пальців з шістьма пальцями, що містить три пальці (з'єднаних двома канонічними лінкерами між пальцями), довгий лінкер і три додаткових пальці (з'єднаних двома канонічними лінкерами між пальцями) позначають як конфігурацію 2×3. Подібним чином, зв'язувальний домен, що містить два пальці (з канонічним лінкером між ними), довгі лінкери і два додаткових пальці (з'єднаних канонічним лінкером), позначають як білок 2×2. Білок, що містить три одиниці з двома пальцями (в кожній з яких два пальці з'єднані канонічним лінкером), в якому кожна одиниця з двома пальцями з'єднана з сусідніми одиницями з двома пальцями довгим лінкером, позначають як білок 3×2.

Присутність в зв'язувальному домені з декількома пальцями між двома сусідніми цинковими пальцями довгого або неканонічного лінкера між пальцями часто дозволяє двом пальцям зв'язуватися з підділянками, які в послідовності-мішені не є безпосередньо суміжними. Таким чином, між підділянками в ділянки-мішені можуть існувати пропуски в один або декілька нуклеотидів; наприклад, ділянка-мішень може містити один або декілька нуклеотидів, які не контактують з цинковим пальцем. Наприклад, зв'язувальний домен цинкових пальців 2×2 може зв'язуватися з двома послідовностями з шести нуклеотидів, розділених одним нуклеотидом, наприклад, він зв'язується з ділянкою-мішенню з 13 нуклеотидів. Також див. Moore et al. (2001a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1432-1436; Moore et al. (2001b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1437-1441 і WO 01/53480.

Як указано раніше, підділянка-мішень являє собою послідовність з трьох або чотирьох нуклеотидів, які зв'язує один цинковий палець. Для певної мети одиницю з двома пальцями позначають як зв'язувальний модуль. Зв'язувальний модуль можна отримувати, наприклад, вибираючи два сусідніх пальці в білку з декількома пальцями (як правило, три пальці), який зв'язує конкретну послідовність-мішень з шести нуклеотидів. Альтернативно, модулі можна конструювати за допомогою збирання окремих цинкових пальців. Також див. WO 98/53057 і WO 01/53480.

У одному з варіантів здійснення в цьому документі описаний зв'язувальний домен цинкових пальців, що містить амінокислотну послідовність, як представлено в таблиці 1. В іншому варіанті здійснення опис стосується полінуклеотиду, що кодує зв'язувальний домен цинкових пальців, де зв'язувальний домен цинкових пальців містить амінокислотну послідовність, як представлено в таблиці 1.

Альтернативно, ДНК-зв'язувальний домен можна отримати з нуклеази. Наприклад, відомі послідовності, що розпізнають хомінг-ендонуклеаз і мегануклеаз, такі як I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceW, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII і I-TevIII. Також див. патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 і каталог New England Biolabs. Крім того, ДНК-зв'язувальну специфічність хомінг-ендонуклеаз і мегануклеаз можна застосовувати в конструюванні для зв'язування неприродних ділянок-мішеней. Див., наприклад, Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; патентну публікацію США № 20070117128.

У інших варіантах здійснення ДНК-зв'язувальний домен містить природний або конструйований (неприродний) ДНК-зв'язувальний домен з TAL-ефектором. Відомо, що патогенні бактерії рослин роду *Xanthomonas* викликають множинну захворювань у важливих сільськогосподарських культур. Патогенність *Xanthomonas* залежить від консервативної системи секреції III типу (T3S), що вводить в рослинну клітину більше 25 різних ефекторних білків. Серед цих ін'єктованих білків знаходяться подібні до активаторів транскрипції (TAL) ефектори, мімікуючі активатори транскрипції рослин і маніпулюючи транскриптомом рослин (див. Kay et al. (2007) Science 318:648-651). Ці білки містять ДНК-зв'язувальний домен і домен активації транскрипції. Одним з найбільш добре охарактеризованих TAL-ефекторів є AvrBs3 з *Xanthomonas campestris* пв. *Vesicatoria* (див. Bonas et al. (1989) Mol Gen Genet 218:127-136 і WO2010079430). TAL-ефектори містять централізований домен з тандемних повторів, де кожний повтор містить приблизно 34 амінокислоти, які є ключовими для специфічності зв'язування ДНК цими білками. Крім того, вони містять послідовність ядерної локалізації і

кислий домен активації транскрипції (для огляду див. Schornack S, et al. (2006) J. Plant Physiol. 163(3):256-272). Крім того, в фітопатогенних бактеріях *Ralstonia solanacearum* в біоварі 1 штаму GMI1000 і в біоварі 4 штаму RS1000 *R. solanacearum* знайдені два гени, позначені *brg11* і *hpx17*, гомологічні сімейству *AvrBs3* *Xanthomonas* (див. Heuer et al. (2007) Appl. and Envir. Micro 73(13):4379-4384). Ці гени на 98,9 % ідентичні по нуклеотидній послідовності один одному, але відрізняються делецією 1575 п. н. в домені *hpx17* з повторами. Однак обидва продукти генів мають менше ніж 40 % ідентичність послідовності з сімейством білків *AvrBs3* *Xanthomonas*.

Специфічність цих TAL-ефекторів залежить від послідовностей, що знаходяться в тандемних повторах. Повторювана послідовність містить приблизно 102 п.н. і повтори, як правило, на 91-100 % гомологічні один одному (Bonas et al., там же). Поліморфізм повторів, як правило, розташований в положеннях 12 і 13, і вважають, що існує відповідність один-в-один між складом гіперваріабельних подвійних залишків в положеннях 12 і 13 зі складом суміжних нуклеотидів в послідовності-мішені TAL-ефектора (див. Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501 і Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512). Експериментально, природний код для розпізнавання ДНК цими TAL-ефекторами визначений так, що послідовність HD в положеннях 12 і 13 приводить до зв'язування з цитозином (C), NG зв'язуються з T, NI з A, C, G або T, NN зв'язується з A або G, а ING зв'язуються T. Ці ДНК-зв'язувальні повтори збирають в білки з новими комбінаціями і кількістю повторів з отриманням штучних факторів транскрипції, які здатні взаємодіяти з новими послідовностями і активувати експресію неендогенного репортерного гена в рослинних клітинах (Boch et al., там же). Конструйовані TAL-білки зв'язували з напівдоменом розщеплення FokI з отриманням зливої нуклеази з TAL-ефекторним доменом (TALEN), що демонструє активність в аналізі з репортером в дріжджах (мішень на основі плазмиди). Christian et al. ((2010) Genetics epub 10.1534/genetics. 110.120717).

Регуляторні домени

З регуляторними доменами для модуляції експресії гена необов'язково можна асоціювати ДНК-зв'язувальні домени (наприклад, ZFP), що описуються в цьому документі. ZFP можна ковалентно або нековалентно зв'язувати з одним або декількома регуляторними доменами, альтернативно двома або більше регуляторними доменами, з двома або більше доменами, що є копіями одного домену, або з двома різними доменами. Регуляторні домени можна ковалентно зв'язувати з ZFP, наприклад, за допомогою амінокислотного лінкера, як частину злитого білка. ZFP також можна зв'язувати з регуляторним доменом за допомогою нековалентного домену димеризації, наприклад лейцинової застіжки, N-кінцевого домену білка STAT або зв'язувального білка FK506 (див., наприклад, O'Shea, Science 254:539 (1991), Barahmand-Pour et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 211:121-128 (1996); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16:569-592 (1998); Klemm et al., Annu. Rev. Immunol. 16:569-592 (1998); Ho et al., Nature 382:822-826 (1996); і Pomeranz et al., Biochem. 37:965 (1998)). Регуляторний домен можна зв'язувати з ZFP в будь-якому відповідному положенні, включаючи C- або N-кінець ZFP.

Загальні регуляторні домени для додавання до ZFP включають, наприклад, ефекторні домени з факторів транскрипції (активатори, репресори, коактиватори, корепресори), сайленсери, рецептори ядерних гормонів, онкогенні фактори транскрипції (наприклад, представники сімейств *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*, *bcl*, *myb*, *mos* і т.д.); ферменти репарації ДНК і асоційовані з ними фактори і модифікатори; ферменти перестановок в ДНК і асоційовані з ними фактори і модифікатори; асоційовані з хроматином білки і їх модифікатори (наприклад, кінази, ацетилази і деацетилази) і ферменти модифікації ДНК (наприклад, метилтрансферази, топоізомерази, гелікази, лігази, кінази, фосфатази, полімерази, ендонуклеази) і асоційовані з ними фактори і модифікатори.

Поліпептиди факторів транскрипції, з яких можна отримувати регуляторний домен, включають поліпептиди, залучені до регульованої і базальної транскрипції. Такі поліпептиди включають фактори транскрипції, їх ефекторні домени, коактиватори, сайленсери, рецептори ядерних гормонів (для огляду білків і елементів нуклеїнових кислот, залучених до транскрипції див., наприклад, Goodrich et al., Cell 84:825-30 (1996); фактори транскрипції в основному розглянуті в Barnes and Adcock, Clin. Exp. Allergy 25 Suppl. 2:46-9 (1995) і Roeder, Methods Enzymol. 273:165-71(1996)). Фактори транскрипції рецепторів ядерних гормонів описані, наприклад, в Rosen et al., J. Med. Chem. 38:4855-74 (1995). Сімейство факторів транскрипції C/EBP розглянуто в Wedel et al., Immunobiology 193:171-85 (1995). Коактиватори і корепресори, які опосередковують регуляцію транскрипції за допомогою рецепторів ядерних гормонів розглянуті, наприклад, в Meier, Eur. J. Endocrinol. 134(2): 158-9 (1996); Kaiser et al., Trends Biochem. Sci. 21:342-5 (1996); і Utley et al., Nature 394:498-502 (1998)). Фактори транскрипції GATA, залучені до регуляцію гемопоезу, описані, наприклад, в Simon, Nat. Genet. 11:9-11 (1995); Weiss et al., Exp. Hematol. 23:99-107. Зв'язувальний TATA-бокс білок (TBP) і асоційовані з ним

TAP-поліпептиди (які включають TAF30, TAF55, TAF80, TAF 10, TAFI 50 і TAF250) описані в Goodrich and Tjian, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:403-9 (1994) і Hurley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:69-75 (1996). Сімейство факторів транскрипції STAT розглянуте, наприклад, в Barahmand-Pour et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:121-8 (1996). Фактори транскрипції, залучені до захворювань, розглянуті в Aso et al., *J. Clin. Invest.* 97:1561-9 (1996).

У одному з варіантів здійснення як репресор транскрипції застосовують репресуючий домен KRAB з білка людини KOX-1 (Thiesen et al., *New Biologist* 2:363-374 (1990); Margolin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4509-4513 (1994); Pengue et al., *Nucl. Acids Res.* 22:2908-2914 (1994); Witzgall et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4514-4518 (1994)). В іншому варіанті здійснення спільно з KRAB застосовують KAP-1, корепресор KRAB (Friedman et al., *Gens Dev.* 10:2067-2078 (1996)). Альтернативно, KAP-1 можна використовувати з ZFP окремо. Інші переважні фактори транскрипції і домени факторів транскрипції, які діють як репресори транскрипції, включають MAD (див., наприклад, Sommer et al., *J. Biol. Chem.* 273:6632-6642 (1998); Gupta et al., *Oncogene* 16:1149-1159 (1998); Queva et al., *Oncogene* 16:967-977 (1998); Larsson et al., *Oncogene* 15:737-748 (1997); Laherty et al., *Cell* 89:349-356 (1997); і Cultraro et al., *Mol. Cell Biol.* 17:2353-2359 (1997)); FKHR (головка в гені рабдосаркоми; Ginsberg et al., *Cancer Res.* 15:3542-3546 (1998); Epstein et al., *Mol. Cell Biol.* 18:4118-4130 (1998)); EGR-1 (продукт гена раннього фактора росту 1; Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8298-8303 (1998); і Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)); репресорний домен фактора репресії ets2 (ERD; Sgouras et al., *EMBO J.* 14:4781-4793 (1995)); домен взаємодії smSIN3 MAD (SID; Ayer et al., *Mol. Cell Biol.* 16:5772-5781 (1996)); і амфіфільний репресуючий домен ERF3 (фактор відповіді на етилен 3), EAR (Ohta, M., et al. (2001), *Plant Cell* 13:1959-1968).

У одному з варіантів здійснення як активатор транскрипції застосовують активуючий домен VP16 HSV (див., наприклад, Hagmann et al., *J. Virol.* 71:5952-5962 (1997)). Інші переважні фактори транскрипції, які можуть забезпечувати активуючі домени, включають активуючий домен VP64 (Seipel et al., *EMBO J.* 11:4961-4968 (1996)); рецептори ядерних гормонів (див., наприклад, Torchia et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:373-383 (1998)); субодиницю p65 ядерного фактора каппа В (Bitko and Barik, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) і Doyle and Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); EGR-1 (продукт гена раннього фактора росту 1; Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8298-8303 (1998); і Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998)); і регуляторний білок шляху біосинтезу антоціаніну кукурудзи, C1 (S.A. Goff, et al., (1991), *Genetics and Development* 5:298-309).

Також як регуляторні домени для ZFP придатні кінази, фосфатази і інші модифікуючі поліпептиди білки, залучені до регуляцію генів. Такі модифікатори часто залучені до запуску або зупинки транскрипції, опосередковані, наприклад, гормонами. Кінази, залучені до регуляції транскрипції, розглянуті в Davis, *Mol. Reprod. Dev.* 42:459-67 (1995), Jackson et al., *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 28:279-86 (1993), і Boulikas, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 5:1-77 (1995), тоді як фосфатази розглянуті, наприклад, в Schonthal and Semin, *Cancer Biol.* 6:239-48 (1995). Ядерні тирозинкінази описані в Wang, *Trends Biochem. Sci.* 19:373-6 (1994).

Як описано, придатні домени також можна отримувати з продуктів генів онкогенів (наприклад, представників сімейств *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*, *bcl*, *myb*, *mos*) і асоційованих з ними факторів і модифікаторів. Онкогени описані, наприклад, в Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed., The Jones and Bartlett Series in Biology, Boston, Mass., Jones and Bartlett Publishers, 1995. Фактори транскрипції *ets* розглянуті в Waslyk et al., *Eur. J. Biochem.* 211:7-18 (1993) і Crepieux et al., *Crit. Rev. Oncog.* 5:615-38 (1994). Онкогени *myc* розглянуті, наприклад, в Ryan et al., *Biochem. J.* 314:713-21 (1996). Фактори транскрипції *jun* і *fos* описані, наприклад, в The Fos and Jun Families of Transcription Factors, Angel and Herrlich, eds. (1994). Онкоген *max* розглянутий в Hurlin et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59:109-16. Сімейство генів *myb* розглянуте в Kanei-Ishii et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:89-98 (1996). Сімейство *mos* розглянуте в Yew et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:19-25 (1993).

ZFP можуть містити регуляторні домени, що отримуються з ферментів репарації ДНК і асоційованих з ними факторів і модифікаторів. Системи репарації ДНК розглянуті, наприклад, в Vos, *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:385-95 (1992); Sancar, *Ann. Rev. Genet.* 29:69-105 (1995); Lehmann, *Genet. Eng.* 17:1-19 (1995); і Wood, *Ann. Rev. Biochem.* 65:135-67 (1996). Також як регуляторні домени можна використовувати ферменти перестановок в ДНК і асоційовані з ними фактори і модифікатори (див., наприклад, Gangloff et al., *Experientia* 50:261-9 (1994); Sadowski, *FASEB J.* 7:760-7 (1993)).

Подібним чином, регуляторні домени можна отримувати з ферментів модифікації ДНК (наприклад, ДНК-метилтрансфераз, -топоізомераз, -геліказ, -лігаз, -кіназ, -фосфатаз, -полімераз) і асоційованих з ними факторів і модифікаторів. Гелікази розглянуті в Matson et al.,

Bioessays, 16:13-22 (1994), а метилтрансферази описані в Cheng, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:4-10 (1995). Також придатними доменами вибору для додавання в ZFP є асоційовані з хроматином білки і їх модифікатори (наприклад, кінази, ацетилази і деацетилази), такі як деацетилаза гістонів (Wolffe, Science 272:371-2 (1996)). В одному з переважних варіантів здійснення регуляторний домен являє собою ДНК-метилтрансферазу, яка діє як репресор транскрипції (див., наприклад, Van den Wyngaert et al., FEBS Lett. 426:283-289 (1998); Flynn et al., J. Mol. Biol. 279:101-116 (1998); Okano et al., Nucleic Acids Res. 26:2536-2540 (1998); і Zardo and Caiafa, J. Biol. Chem. 273:16517-16520 (1998)). В іншому переважному варіанті здійснення як репресори транскрипції, які діють за допомогою розщеплення генів, використовують ендонуклеази, такі як FokI (див., наприклад, WO95/09233 і PCT/US94/01201).

Також для отримання химерних білків можна використовувати фактори, які контролюють структуру, переміщення і локалізацію хроматину і ДНК і асоційовані з ними фактори і модифікатори; фактори, що отримуються з мікроорганізмів (наприклад, прокаріот, еукаріот і вірусів), і фактори, асоційовані з ними або що модифікують їх. У одному з варіантів здійснення як регуляторні домени використовують рекомбінази і інтегрази. У одному з варіантів здійснення як активатор транскрипції застосовують гістонацетильтрансферазу (див., наприклад, Jin and Scotto, Mol. Cell Biol. 18:4377-4384 (1998); Wolffe, Science 272:371-372 (1996); Taunton et al., Science 272:408-411 (1996); і Hassig et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3519-3524 (1998)). В іншому варіанті здійснення як репресор транскрипції застосовують гістондеацетилазу (див., наприклад, Jin and Scotto, Mol. Cell Biol. 18:4377-4384 (1998); Syntichaki and Thireos, J. Biol. Chem. 273:24414-24419 (1998); Sakaguchi et al., Genes Dev. 12:2831-2841 (1998); і Martinez et al., J. Biol. Chem. 273:23781-23785 (1998)).

Можна включати лінкерні домени між поліпептидними доменами, наприклад, між двома ZFP або між ZFP і регуляторним доменом. Такі лінкери, як правило, являють собою поліпептидні послідовності, такі як послідовності полі-gly довжиною приблизно від 5 до 200 амінокислот. Лінкери можуть являти собою гнучкі або жорсткі підпослідовності амінокислот, що синтезуються як частина злитого рекомбінантного білка. Див., наприклад, патент США № 6534261; Liu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 95:5525-5530 (1997); Pomerantz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92:9752-9756 (1995); Kim et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:1156-1160 (1996); повністю включені в цей документ за допомогою посилання. Альтернативно, гнучкі лінкери можна раціонально складати з використанням комп'ютерної програми, здатної до моделювання ділянок зв'язування ДНК і самих пептидів (Desjarlais and Berg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:2256-2260 (1993), Desjarlais and Berg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:11099-11103 (1994), або способами фагового дисплея.

У інших варіантах здійснення для зв'язування синтетично або рекомбінантно отримуваних послідовностей доменів використовують хімічний лінкер. Такі гнучкі лінкери відомі фахівцям в даній галузі. Наприклад, в Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala доступні полі(етиленгліколеві) лінкери. Ці лінкери необов'язково містять амідні зв'язки, сульфгідрильні зв'язки або гетерофункціональні зв'язки. Крім ковалентного зв'язку ZFP з регуляторними доменами, для отримання молекул з ZFP, зв'язаними з регуляторними доменами, можна використовувати нековалентні способи.

Домени розщеплення

Як указано вище, ДНК-зв'язувальний домен також можна зв'язувати з доменом розщеплення (нуклеазою). Наприклад, можна модифікувати специфічність зв'язування ДНК хомінг-ендонуклеаз, зберігаючи нуклеазну функцію. Крім того, білки з цинковими пальцями також можна зливати з доменом розщеплення з формуванням нуклеаз з цинковими пальцями (ZFN). Частина домену розщеплення злитих білків, що описуються в цьому документі, можна отримувати з будь-якої ендонуклеази або екзонуклеази. Ілюстративні ендонуклеази, з яких можна отримувати домени розщеплення, як необмежувальні приклади включають рестрикційні ендонуклеази і хомінг-ендонуклеази. Див., наприклад, Каталог 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; і Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388. Відомі додаткові ферменти, що розщеплюють ДНК (наприклад, нуклеаза S1; нуклеаза бобів мунг; панкреатична ДНКаз I; мікрококова нуклеаза; ендонуклеаза дріжджів HO; також див. Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Один або декілька з цих ферментів (або їх функціональні фрагменти) можна використовувати як джерела доменів розщеплення і напівдоменів розщеплення.

Подібним чином, з будь-якої нуклеази або її частини, як указано вище, можна отримувати напівдомени розщеплення, якому для вияву розщеплюючої активності необхідна димеризація. Як правило, якщо злиті білки містять напівдомени розщеплення, для розщеплення необхідні два злиті білки. Альтернативно, можна використовувати один білок, що містить два напівдомени

розщеплення. Два напівдомени розщеплення можна отримувати з однієї і тієї ж ендонуклеази (або її функціональних фрагментів), або кожний напівдомен розщеплення можна отримувати з різних ендонуклеаз (або їх функціональних фрагментів). Крім того, ділянки-мішені для двох злитих білків переважно розташовані одна відносно одної так, щоб зв'язування двох злитих білків з їх відповідними ділянками-мішенями вміщувало напівдомени розщеплення в просторовій орієнтації один відносно одного так, щоб забезпечувати формування напівдоменами розщеплення функціонального домену розщеплення, наприклад, за допомогою димеризації. Таким чином, в певних варіантах здійснення найближчі межі ділянок-мішеней розділені 5-8 нуклеотидами або 15-18 нуклеотидами. Однак між двома ділянками-мішенями може знаходитися будь-яка цілочисельна кількість нуклеотидів або пара нуклеотидів (наприклад, від 2 до 50 пар нуклеотидів або більше). Як правило, ділянка розщеплення розташована між ділянками-мішенями.

Рестрикційні ендонуклеази (рестрикційні ферменти) існують у багатьох видів і здатні до специфічного для послідовності зв'язування з ДНК (в ділянках розпізнавання) і розщеплення ДНК в ділянках зв'язування або поруч з нею. Певні рестрикційні ферменти (наприклад, типу IIS) розщеплюють ДНК в ділянках поза ділянкою розпізнавання і містять роздільні домени зв'язування і розщеплення. Наприклад, фермент типу IIS FokI каталізує дволанцюжкове розщеплення ДНК, в 9 нуклеотидах від його ділянки розпізнавання на одному ланцюгу і в 13 нуклеотидах від його ділянки розпізнавання на іншому. Див., наприклад, патенти США 5356802; 5436150 і 5487994; а також Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31978-31982. Таким чином, в одному з варіантів здійснення злиті білки містять домен розщеплення (або напівдомен розщеплення) щонайменше з одного рестрикційного ферменту типу IIS і один або декілька зв'язувальних доменів цинкових пальців, які можуть бути такими, що конструюються або ні.

Ілюстративним рестрикційним ферментом типу IIS, домен розщеплення якого знаходиться окремо від зв'язувального домену, є FokI. Цей конкретний фермент активний як димер. Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10570-10575. Таким чином, для цілей даного опису, частину ферменту FokI, що використовується в описуваних злитих білках, розглядають як напівдомен розщеплення. Таким чином, для направленої дволанцюжкової розщеплення і/або направленої заміщення клітинних послідовностей з використанням злиття цинковий палець-FokI, для відновлення каталітично активного домену розщеплення можна використовувати два злитих білки, де кожний містить напівдомен розщеплення FokI. Альтернативно, також можна використовувати одну поліпептидну молекулу, що містить зв'язувальний домен цинкових пальців і два напівдомени розщеплення FokI. Параметри для направленої розщеплення і направленої зміни послідовності з використанням злиття цинковий палець-FokI надані в іншій частині даного опису.

Домен розщеплення або напівдомен розщеплення може являти собою будь-яку частину білка, що зберігає розщеплювальну активність або зберігає здатність до мультимеризації (наприклад, димеризації) з формуванням функціонального домену розщеплення.

Ілюстративні рестрикційні ферменти типу IIS описані в міжнародній публікації WO 07/014275, повністю включеній в цей документ. Також окремі домени зв'язування і розщеплення містять додаткові рестрикційні ферменти, і передбачені в даному описі. Див., наприклад, Roberts et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

У певних варіантах здійснення домен розщеплення містить один або декілька конструйованих напівдоменів розщеплення (що також позначаються як мутантні домени, які димеризуються), що мінімізують або запобігають гомодимеризації, як описано, наприклад, в патентних публікаціях США №№ 20050064474; 20060188987; 20080131962, всі описи яких повністю включені в цей документ за допомогою посилання. Мішенями для впливу на димеризацію напівдоменів розщеплення FokI є амінокислотні залишки в положеннях 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 і 538 FokI.

Ілюстративні конструйовані напівдомени розщеплення FokI, що формують облігатні гетеродимери, включають пару, в якій перший напівдомен розщеплення містить мутації по амінокислотних залишках в положеннях 490 і 538 FokI, а другий напівдомен розщеплення містить мутації по амінокислотних залишках 486 і 499.

Таким чином, в певних варіантах здійснення мутація в 490 замінює Glu (E) на Lys (K); мутація в 538 замінює Iso (I) на Lys (K); мутація в 486 замінює Gln (Q) на Glu (E); а мутація в положенні 499 замінює Iso (I) на Lys (K). Зокрема, конструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в цьому документі, отримували за допомогою внесення мутацій в положення 490 (E→K) і 538 (I→K) в одному з напівдоменів розщеплення з отриманням конструйованого

напівдомену розщеплення, що позначається "E490K:I538K", і за допомогою внесення мутацій в положення 486 (Q→E) і 499 (I→L) в іншому напівдомені розщеплення з отриманням сконструйованого напівдомену розщеплення, що позначається "Q486E:I499K". Конструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в цьому документі, є облігатними мутантними гетеродимерами, в яких мінімізоване або усунене порушене розщеплення. Див., наприклад, приклад 1 патентної публікації США № 2008/0131962, опис якої повністю включений за допомогою посилання для всіх цілей. Також див. Szczepek et al. (2007) *Nat Biotechnol* 25:786-793. В певних варіантах здійснення конструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 486, 499 і 496 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Gln (Q) в положенні 486 на залишок Glu (E), залишок дикого типу Iso (I) в положенні 499 на залишок Leu (L) і залишок дикого типу Asn (N) в положенні 496 на Asp (D) або залишок Glu (E) (що також позначається як домени "ELD" і "ELE", відповідно). У інших варіантах здійснення конструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490, 538 і 537 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Glu (E) в положенні 490 на залишок Lys (K), залишок дикого типу Iso (I) в положенні 538 на залишок Lys (K) і залишок дикого типу His (H) в положенні 537 на залишок Lys (K) або залишок Arg (R) (що також позначається як домени "KKK" і "KKR", відповідно). У інших варіантах здійснення конструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490 і 537 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Glu (E) в положенні 490 на залишок Lys (K) і залишок дикого типу His (H) в положенні 537 на залишок Lys (K) або залишок Arg (R) (що також позначається як домени "KIK" і "KIR", відповідно). (Див. попередню заявку США 61/337769, подану 8 лютого 2010 року). У інших варіантах здійснення конструйований напівдомен розщеплення містить мутації "Sharkey" і/або "Sharkey" (див. Guo et al., (2010) *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2010.04.060).

Конструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в цьому документі можна отримувати будь-яким прийнятним способом, наприклад, за допомогою сайтспецифічного мутагенезу напівдоменів розщеплення дикого типу (FokI), як описано в патентних публікаціях США №№ 20050064474 і 20080131962.

Іншим переважним рестрикційним ферментом типу IIS є BfiI (див. Zaremba et al., (2004) *J. Mol Biol.* 336(1):81-92). Домен розщеплення цього ферменту можна відділяти від його ДНК-зв'язувального домену і функціонально зв'язувати з ДНК-зв'язувальним доменом цинкових пальців з отриманням ZFN.

Злиті білки

Способи складання і конструювання злитих білків (і полінуклеотиди, що кодують їх) відомі фахівцям в даній галузі. Наприклад, способи складання і конструювання злитих білків, що містить ДНК-зв'язувальний домен (наприклад, домен цинкових пальців) і регуляторні домени або домени розщеплення (або напівдомени розщеплення), і полінуклеотидів, що кодують такі злиті білки, описані в патентах США, що належать тим же заявникам 6453242 і 6534261 і публікаціях патентних заявок США 2007/0134796 і 2005/0064474; повністю включених в цей документ за допомогою посилання.

У певних варіантах здійснення конструюють полінуклеотиди, що кодують злиті білки. Ці полінуклеотиди можна вставляти у вектор, а вектор вводити в клітину (див. нижче для додаткового опису векторів і способів введення полінуклеотидів в клітину).

Як указано вище, в певних варіантах здійснення злитий білок містить білок з цинковими пальцями, що зв'язується з ділянкою-мішенню в гені, залученому до біосинтезу жирних кислот, і щонайменше один домен регуляції транскрипції, наприклад, активуючий або репресуючий домен.

У інших варіантах здійснення способів, що описуються в цьому документі, нуклеази з цинковими пальцями містять злитий білок, що містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення з рестрикційного ферменту FokI, і в клітині експресуються два таких білки. Експресія двох злитих білків в клітині може бути результатом доставки в клітину двох білків; доставки в клітину одного білка і однієї нуклеїнової кислоти, що кодує один з білків; доставки в клітину двох нуклеїнових кислот, де кожна кодує один з білків; або доставки в клітину однієї нуклеїнової кислоти, що кодує обидва білки. У додаткових варіантах здійснення злитий білок містить один поліпептидний ланцюг, що містить два напівдомени розщеплення і зв'язувальний домен цинкових пальців. У цьому випадку в клітині експресується один злитий білок і, не бажаючи бути пов'язаним теорією, вважають, що він розщеплює ДНК в результаті формування внутрішньомолекулярного димера з напівдоменів розщеплення.

У певних варіантах здійснення компоненти нуклеаз з цинковими пальцями (наприклад, злиття ZFP-FokI) розташовані так, що домен цинкових пальців розташований ближче до N-кінця

злитого білка, а напівдомен розщеплення розташований ближче до С-кінця. Це є дзеркальним відображенням відносної орієнтації домену розщеплення в природних доменах розщеплення, які димеризуються, таких як домени, які походять з ферменту FokI, в якому ДНК-зв'язувальний домен розташований ближче до N-кінця, а напівдомен розщеплення розташований ближче до С-кінця. У цих варіантах здійснення димеризація напівдоменив розщеплення з формуванням функціональної нуклеази зумовлена зв'язуванням злитих білків з ділянками на протилежних ланцюгах ДНК, де 5'-кінці ділянок зв'язування розташовані проксимально один відносно одного.

У додаткових варіантах здійснення компоненти злитих білків (наприклад, злиття ZFV-FokI) розташовані так, що напівдомен розщеплення розташований ближче до N-кінця злитого білка, а домен цинкових пальців розташований ближче до С-кінця. У цих варіантах здійснення димеризація напівдоменив розщеплення з формуванням функціональної нуклеази зумовлена зв'язуванням злитих білків з ділянками на протилежних ланцюгах ДНК, де 3'-кінці ділянок зв'язування розташовані проксимально один відносно одного.

У додаткових варіантах здійснення перший злитий білок містить напівдомен розщеплення ближче до N-кінця злитого білка, а домен цинкових пальців ближче до С-кінця, а другий злитий білок сконструйований так, що домен цинкових пальців розташований ближче до N-кінця злитого білка, а напівдомен розщеплення розташований ближче до С-кінця. У цих варіантах здійснення обидва злитих білки зв'язуються з одним і тим же ланцюгом ДНК, де ділянка зв'язування першого злитого білка, яка містить домен цинкових пальців ближче до С-кінця, розташована з 5'-кінця від ділянки зв'язування другого злитого білка, що містить домен цинкових пальців ближче до N-кінця.

У певних варіантах здійснення описаних злитих білків амінокислотна послідовність між доменом цинкових пальців і доменом розщеплення (або напівдоменом розщеплення) означають "ZC-лінкер". ZC-лінкер потрібно відрізнати від лінкерів між пальцями, описаних вище. Для подробиць отримання ZC-лінкерів, що оптимізують розщеплення, див., наприклад, патентні публікації США 20050064474A1 і 20030232410 і міжнародну патентну публікацію WO05/084190.

У одному з варіантів здійснення опис стосується білка, який містить ZFN, з цинковими пальцями з амінокислотними послідовностями з розпізнавальними спіралями, представленими в таблиці 1 або таблиці 10. У іншому варіанті здійснення в цьому документі наданий експресуючий ZFN вектор, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує ZFP з розпізнавальними спіралями, представленими в таблиці 1 або таблиці 10.

Регуляція експресії гена

Для визначення того, чи модуля є ZFP експресію генів, можна використовувати множину аналізів. Активність конкретного ZFP можна оцінювати з використанням множини аналізів *in vitro* і *in vivo*, вимірюючи, наприклад, рівні білка або мРНК, рівні продуктів, активність ферменту; активацію або репресію транскрипції репортерного гена, наприклад, з використанням імунологічних аналізів (наприклад, ELISA і імуногістохімічних аналізів з антитілами), аналізів гібридизації (наприклад, захисти від РНКази, нозерн-блот, гібридизацію *in situ*, дослідження олігонуклеотидних панелей), колориметричних аналізів, аналізів ампліфікації, аналізів активності ферментів, аналізів фенотипу і т. п.

Як правило, ZFP спочатку тестують на активність *in vitro* з використанням аналізів ELISA, а потім з використанням клітин нирки. Часто ZFP спочатку тестують з використанням системи транзиторної експресії з репортерним геном, а потім тестують регуляцію ендogenous гена-мішені в клітинах і в цілих рослинах, *in vivo* і *ex vivo*. ZFP можна рекомбінантно експресувати в клітині, рекомбінантно експресувати в клітинах, трансплантованих в рослину, або рекомбінантно експресувати в трансгенній рослині, а також вводити в рослину або клітину у вигляді білка з використанням доставляючих носіїв, описаних нижче. Клітини можуть бути іммобілізовані, знаходитися в розчині, їх можна ін'єкувати в рослину, або вони можуть знаходитися в природі в трансгенній або нетрансгенній рослині.

Модуляцію експресії гена тестують з використанням одного з аналізів *in vitro* або *in vivo*, що описуються в цьому документі. Зразки або аналізи обробляють ZFP і порівнюють з контрольними зразками без тестованої сполуки для дослідження ступеня модуляції. Для регуляції ендogenous експресії гена, ZFP, як правило, має K_d 200 нМ або менше, більш переважно - 100 нМ або менше, більш переважно - 50 нМ, найбільш переважно - 25 нМ або менше.

Ефекти ZFP можна вимірювати, досліджуючи будь-який з параметрів, описаних вище. Для оцінки впливу ZFP можна використовувати будь-яку відповідну зміну експресії гена, фенотипову або фізіологічну зміну. Коли функціональні наслідки визначають з використанням інтактних клітин або рослин, також можна вимірювати ряд таких ефектів, як ріст рослин, зміни транскрипції відомих і неохарактеризованих генетичних маркерів (наприклад, дослідження

нозерн-блотингу або олігонуклеотидних панелей), зміни клітинного метаболізму, такі як зміни росту клітин або pH, і зміни внутрішньоклітинних вторинних месенджерів, таких як cGMP.

Переважні аналізи для регуляції ZFP ендогенної експресії гена можна проводити *in vitro*. У одному з переважних форматів аналізу *in vitro*, регуляцію ZFP ендогенної експресії гена в культивованих клітинах вимірюють, досліджуючи продукцію білка з використанням аналізу ELISA. Тестований зразок порівнюють з контрольними клітинами, що обробляються пустим вектором або стороннім ZFP, який направлений на інший ген.

У іншому варіанті здійснення регуляцію ZFP ендогенної експресії гена визначають *in vitro*, вимірюючи рівень експресії мРНК гена-мішені. Рівень експресії гена вимірюють з використанням ампліфікації, наприклад, з використанням ПЛР, LCR або аналізів гібридизації, наприклад, нозерн-гібридизації, захисти від РНКаз, дот-блотингу. У одному з варіантів здійснення використовують захист від РНКаз. Рівень білка або мРНК детектують з використанням безпосередньо або опосередковано мічених засобів для детекції, наприклад, флуоресцентно або радіоактивно мічених нуклеїнових кислот, радіоактивно або ферментативно мічених антитіл і т. п., як описано в цьому документі.

Альтернативно, можна розробляти систему з репортерним геном з використанням промотору гена-мішені, функціонально зв'язаного з репортерним геном, таким як люцифераза, зелений флуоресцентний білок, CAT або β -gal. Як правило, репортерну конструкцію котрансфікують в культивовану клітину. Після обробки вибраним ZFP кількісно вимірюють транскрипцію, трансляцію або активність репортерного гена стандартними способами, відомими фахівцям в даній галузі.

Також як переважний варіант винаходу для дослідження регуляції ендогенної експресії гена *in vivo* використовують трансгенні і нетрансгенні рослини. Трансгенні рослини можуть стабільно експресувати вибраний ZFP. Альтернативно, можна використовувати рослини, які транзитивно експресують вибраний ZFP або в які вводять ZFP в доставляючому носії. Регуляцію ендогенної експресії гена тестують з використанням будь-якого з аналізів, що описуються в цьому документі.

Способи направлено розщеплення

Описувані способи і композиції можна використовувати для розщеплення ДНК в області, яка представляє інтерес, в клітинному хроматині (наприклад, в бажаній або визначеній наперед ділянці геному, наприклад в гені, залученому до біосинтезу жирних кислот, або поруч з нею). Для такого направлено розщеплення ДНК, зв'язувальний домен цинкових пальців конструюють для зв'язування з ділянкою-мішенню у визначеній наперед ділянці розщеплення або поруч з нею, і злитий білок, що містить конструйований зв'язувальний домен цинкових пальців і домен розщеплення, експресують в клітині. Після зв'язування частини злитого білка з цинковими пальцями з ділянкою-мішенню, домен розщеплення розщеплює ДНК поруч з ділянкою-мішенню. Точна ділянка розщеплення може залежати від довжини ZC-лінкера.

Альтернативно, в клітині експресують два злитих білки, де кожний містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення, і зв'язують з ділянками-мішенями, які розташовані поруч таким чином, що відновлюється функціональний домен розщеплення і розщеплює ДНК поруч з ділянками-мішенями. У одному з варіантів здійснення розщеплення відбувається між ділянками-мішенями двох зв'язувальних доменів цинкових пальців. Один або обидва зв'язувальні домени цинкових пальців можуть бути конструйованими.

Для направлено розщеплення з використанням злитого поліпептиду із зв'язувального домену цинкових пальців-домену розщеплення ділянка зв'язування може містити ділянку розщеплення, або ближній кінець ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25, 50 або більше нуклеотидів (або на будь-якому цілочисельному значенні від 1 до 50 нуклеотидів) від ділянки розщеплення. Точне положення ділянки зв'язування відносно ділянки розщеплення залежить від конкретного домену розщеплення і довжини ZC-лінкера. Для способів, в яких використовують два злитих поліпептиди, де кожний містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення, ділянки зв'язування, як правило, розташовані з двох сторін від ділянки розщеплення. Таким чином, ближній кінець першої ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25 або більше нуклеотидів (або на будь-якому цілочисельному значенні від 1 до 50 нуклеотидів) від однієї зі сторін від ділянки розщеплення, і ближній кінець другої ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25 або більше нуклеотидів (або на будь-якому цілочисельному значенні від 1 до 50 нуклеотидів) від іншої сторони ділянки розщеплення. Способи картування ділянок розщеплення *in vitro* і *in vivo* відомі фахівцям в даній галузі.

Таким чином, в способах, що описуються в цьому документі, можна використовувати конструйований зв'язувальний домен цинкових пальців, злитий з доменом розщеплення. У цих

випадках зв'язувальний домен конструюють для зв'язування з послідовністю-мішенню в місці, де бажане розщеплення, або поруч з ним. Злитий білок або полінуклеотид, що кодує його, вводять в рослинну клітину. Після введення в клітину або експресії в ній злитий білок зв'язується з послідовністю-мішенню і проводить розщеплення в послідовності-мішені або поруч з нею. Точна ділянка розщеплення залежить від характеру домену розщеплення і/або присутності і/або характеру лінкерних послідовностей між доменами зв'язування і розщеплення. У випадках, коли використовують два злитих білки, де кожний містить напівдомен розщеплення, відстань між найближчими межами ділянок зв'язування може становити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25 або більше нуклеотидів (або будь-яке цілочисельне значення від 1 до 50 нуклеотидів). Оптимальні рівні розщеплення також можуть залежати від відстані між ділянками зв'язування двох злитих білків (див., наприклад, Smith et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:3361-3369; Bibikova et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21:289-297) і довжини ZC-лінкерів в кожному злитому білку. Також див. патентну публікацію США 20050064474A1 і міжнародні патентні публікації WO05/014791 і WO03/080809.

У певних варіантах здійснення домен розщеплення містить два напівдомени розщеплення, які обидва є частиною одного поліпептиду, що містить зв'язувальний домен, перший напівдомен розщеплення і другий напівдомен розщеплення. Напівдомени розщеплення можуть мати однакову амінокислотну послідовність або різні амінокислотні послідовності за умови, що вони функціонують з розщепленням ДНК.

Напівдомени розщеплення також можна надавати в окремих молекулах. Наприклад, в клітину можна вводити два злитих поліпептиди, де кожний поліпептид містить зв'язувальний домен і напівдомен розщеплення. Напівдомени розщеплення можуть мати однакову амінокислотну послідовність або різні амінокислотні послідовності за умови, що вони функціонують з розщепленням ДНК. Крім того, зв'язувальні домени зв'язуються з послідовностями-мішенями, які, як правило, розташовані таким чином, що після зв'язування злитих поліпептидів, два напівдомени розщеплення представляються один відносно одного в просторовій орієнтації, що забезпечує відновлення домену розщеплення (наприклад, за допомогою димеризації напівдоменив), таким чином, розташовуючи напівдомени один відносно одного з формуванням функціонального домену розщеплення, що приводить до розщеплення клітинного хроматину в області, яка представляє інтерес. Як правило, розщеплення відновленим доменом розщеплення відбувається в ділянці, розташованій між двома послідовностями-мішенями. Один або обидва білки можуть бути сконструйовані для зв'язування з їх ділянкою-мішенню.

Два злитих білки можуть зв'язуватися в області, яка представляє інтерес, в одній і тій же або протилежній полярності, і їх ділянки зв'язування (тобто, ділянки-мішені) можуть розділятися будь-якою кількістю нуклеотидів, наприклад, від 0 до 200 нуклеотидів або будь-яким цілочисельним значенням між ними. У певних варіантах здійснення ділянки зв'язування для двох злитих білків, де кожна містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення, можуть розташовуватися на відстані від 5 до 18 нуклеотидів, наприклад, на відстані 5-8 нуклеотидів, або на відстані 15-18 нуклеотидів або на відстані 6 нуклеотидів або на відстані 16 нуклеотидів, як вимірюють від кінця кожної ділянки зв'язування, найближчого до іншої ділянки зв'язування, а розщеплення відбувається між ділянками зв'язування.

Ділянка, в якій розщеплюється ДНК, як правило, розташована між ділянками зв'язування для двох злитих білків. Дволанцюжковий розрив ДНК часто є результатом двох одноланцюжкових розривів або "ніків" зі зміщенням на 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше нуклеотидів (наприклад, розщеплення дволанцюжкової ДНК природної FokI є результатом одноланцюжкових розривів зі зміщенням на 4 нуклеотиди). Таким чином, розщеплення не обов'язково відбувається точно на протилежних сторонах кожного ланцюга ДНК. Крім того, структура злитих білків і відстань між ділянками-мішенями може впливати на те, чи станеться розщеплення поруч з однією парою нуклеотидів, або розщеплення станеться в різних ділянках. Однак для більшості застосувань, включаючи направлену рекомбінацію і направлений мутагенез (див. нижче), як правило, достатньо розщеплення в деякому діапазоні нуклеотидів, і розщеплення між конкретними парами основ не потрібно.

Як указано вище, злитий білок(ки) можна вводити у вигляді поліпептидів і/або у вигляді полінуклеотидів. Наприклад, в клітину можна вводити два полінуклеотиди, де кожний містить послідовності, що кодують один з вказаних вище поліпептидів, і коли поліпептиди експресуються і кожний зв'язується з його послідовністю-мішенню, відбувається розщеплення в послідовності-мішені або поруч з нею. Альтернативно, в клітину вводять один полінуклеотид, що містить послідовності, що кодують обидва злитих поліпептиди. Полінуклеотиди можуть являти собою ДНК, РНК або будь-які модифіковані форми або аналоги ДНК і/або РНК.

Для збільшення специфічності розщеплення в способах, що описуються в цьому документі, можна використовувати додаткові композиції. Наприклад, одиночні напівдомени розщеплення можуть виявляти обмежену активність розщеплення двох ланцюгів. У способах, де в клітину вводять два злитих білки, де кожний містить домен цинкових пальців з трьома пальцями і напівдомени розщеплення, кожний білок визначає ділянку-мішень приблизно з 9 нуклеотидів. Хоча сукупна послідовність-мішень з 18 нуклеотидів, ймовірно, є унікальною в геномах ссавців і рослин, будь-яка дана ділянка-мішень з 9 нуклеотидів в середньому в геномі людини зустрічається приблизно 23000 разів. Таким чином, може відбуватися неспецифічне розщеплення, внаслідок специфічного зв'язування одного напівдомени з ділянкою. Таким чином, способи, що описуються в цьому документі, передбачають використання домінантно-негативного мутанта напівдомени розщеплення, такого як FokI (або нуклеїнової кислоти, що кодує його), який експресується в клітині разом з двома злитими білками. Домінантно-негативний мутант здатний до димеризації, але не здатний до розщеплення, а також блокує розщеплювальну активність напівдомени з яким він димеризується. Забезпечуючи молярний надлишок домінантно-негативного мутанта по відношенню до злитих білок, тільки в областях, в яких зв'язані обидва злиті білки, буде міститися досить висока локальна концентрація функціональних напівдомени розщеплення для проходження димеризації і розщеплення. У ділянках, де зв'язаний тільки один з двох злитих білків, його напівдомени розщеплення формує димер з домінантно-негативним мутантним напівдоменом, і небажаного, неспецифічного розщеплення не відбувається.

Експресуючі вектори

Нуклеїнову кислоту, що кодує один або декілька білків (наприклад, ZFP), як описано в цьому документі, можна клонувати у вектор для трансформації в прокаріотичні або еукаріотичні клітини для реплікації і/або експресії. Вектори можуть являти собою прокаріотичні вектори, наприклад, плазміди або човникові вектори, вектори комах, вірусні вектори або еукаріотичні вектори. Нуклеїнову кислоту, що кодує ZFP, також можна клонувати в експресуючий вектор для введення в рослинну клітину.

Для експресії ZFP, послідовності, що кодують ZFP, як правило, субклонують в експресуючий вектор, що містить промотор, який контролює транскрипцію. Прийнятні бактерійні і еукаріотичні промотори добре відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989; 3rd ed., 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* Stockton Press, New York (1990); і *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., вище). Бактерійні експресуючі системи для експресії ZFP доступні, наприклад, для *E. coli*, видах *Bacillus* і *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983)). Набори для таких експресуючих систем є комерційно доступними. Еукаріотичні експресуючі системи для клітин ссавців, рослин, дріжджів і комах добре відомі фахівцям в даній галузі і також є комерційно доступними.

Промотор, що використовується для контролю експресії кодуючої ZFP нуклеїнової кислоти, залежить від конкретного застосування. Наприклад, для експресії і очищення ZFP, як правило, використовують сильний конститутивний промотор, прийнятний для клітини-хазяя.

На відміну від цього, коли ZFP вводять *in vivo* для регуляції генів рослини (див., розділ "доставка нуклеїнових кислот в рослинні клітини", нижче), залежно від конкретного застосування ZFP використовують або конститутивний або індукцйбельний промотор. Необмежувальні приклади промоторів рослин включають промоторні послідовності, що отримуються з убіквітину-3 *A. thaliana* (ubi-3) (Callis, et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265:12486-12493); манопінсинтази *A. tumefaciens* (Δmas) (Petolino et al., патент США № 6730824); і/або вірус мозаїки жилок маніоки (CsVMV) (Verdaguer et al., (1996), *Plant Molecular Biology* 31:1129-1139). Також див. розділ прикладів.

Крім промотору, експресуючий вектор, як правило, містить транскрипційну одиницю або експресуючу касету, яка містить всі додаткові елементи, необхідні для експресії нуклеїнової кислоти в клітинах-хазяїнах, прокаріотичних або еукаріотичних. Таким чином, типова експресуюча касета містить промотор, функціонально зв'язаний, наприклад, з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує ZFP, і сигнали, необхідні, наприклад, для ефективного поліаденілування транскрипту, термінації транскрипції, ділянок зв'язування рибосом або термінації трансляції. Додаткові елементи касети можуть включати, наприклад, енхансери, гетерологічні сигнали сплайсингу і/або сигнал ядерної локалізації (NLS).

Конкретний експресуючий вектор, що використовується для перенесення генетичної інформації в клітину, вибирають, враховуючи плановане застосування ZFP, наприклад, експресію у рослин, тваринних, бактерій, грибів, найпростіших і т.д. (див. експресуючі вектори, описані нижче). У даній галузі відомі і детально описані стандартні експресуючі вектори бактерій

і тварин, наприклад, в патентній публікації США 20050064474A1 і в міжнародних патентних публікаціях WO05/084190, WO05/014791 і WO03/080809.

Для отримання ліній клітин бактерій, ссавців, рослин, дріжджів або комах, які експресують великі кількості білка, які потім можна очищати стандартними способами, можна використовувати стандартні способи трансфекції (див., наприклад, Colley et al., J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). Трансформацію еукаріотичних і прокаріотичних клітин проводять стандартними способами (див., наприклад, Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss and Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu et al., eds., 1983)).

Можна використовувати будь-який з добре відомих способів введення чужорідних нуклеотидних послідовностей в такі клітини-хазяїни. Вони включають використання трансфекції з фосфатом кальцію, полібрену, злиття протопластів, електропорації, ультразвукових способів (наприклад, сонопорації), ліпосом, мікроін'єкції, "голих" ДНК, плазмідних векторів, вірусних векторів, епісомного і інтегративного способу і будь-якого з інших добре відомих способів введення клонованої геномної ДНК, кДНК, синтетичної ДНК або іншого чужорідного генетичного матеріалу в клітину-хазяя (див., наприклад, Sambrook et al., вище). Необхідно тільки, щоб конкретним використовуваним способом генетичної інженерії можна було результативно вводити в клітину-хазяя, здатну до експресії вибраного білка, щонайменше один ген.

Доставка нуклеїнових кислот в рослинні клітини

Як указано вище, конструкції ДНК можна вводити в (наприклад, в геном) бажану рослину-хазяя множиною загальноприйнятих способів. Для огляду таких способів див., наприклад, Weissbach and Weissbach Methods for Plant Molecular Biology (1988, Academic Press, N.Y.) Section VIII, pp. 421-463; і Grierson and Corey, Plant Molecular Biology (1988, 2d Ed.), Blackie, London, Ch. 7-9.

Наприклад, конструкцію ДНК можна вводити безпосередньо в геномну ДНК рослинної клітини з використанням таких способів, як електропорація і мікроін'єкція в протопласти рослинної клітини, або конструкції ДНК можна вводити безпосередньо в тканину рослини з використанням біолістичних способів, таких як бомбардування частинками з ДНК (див., наприклад, Klein et al., (1987) Nature 327:70-73). Альтернативно, конструкції ДНК можна комбінувати з відповідними фланкуючими областями Т-ДНК і вводити в загальноприйнятому векторі-хазяїні *Agrobacterium tumefaciens*. Опосередковані *Agrobacterium tumefaciens* способи трансформації, включаючи нейтралізацію і використання бінарних векторів, добре описані в науковій літературі. Див., наприклад, Horsch et al., (1984) Science 233:496-498 і Fraley et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803.

Крім того, перенесення генів можна здійснювати із застосуванням *Agrobacterium* бактерій, що не є або вірусів, таких як види *Rhizobium* NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, вірус картоплі X, вірус мозаїки цвітної капуста і вірус мозаїки жилок маніоки і/або вірус тютюнової мозаїки. Див., наприклад, Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1): 1-4.

Вірулентна дія хазяя *Agrobacterium tumefaciens*, коли клітину інфікують бактеріями з використанням бінарного вектора Т-ДНК (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12:8711-8721) або способів спільного культивування (Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231), зумовлює вставляння конструкції і прилеглого маркера в ДНК рослинної клітини. Як правило, систему трансформації з *Agrobacterium* застосовують для конструювання дводольних рослин (Bevan et al., (1982) Ann. Rev. Genet 16:357-384; Rogers et al., (1986) Methods Enzymol. 118:627-641). Систему трансформації з *Agrobacterium* також можна використовувати для трансформації, а також перенесення ДНК в однодольні рослини і рослинні клітини. Див. патент США № 5591616; Hernalsteen et al., (1984) EMBO J. 3:3039-3041; Hooykass-Van Slogteren et al., (1984) Nature 311:763-764; Grimsley et al. (1987) Nature 325:1677-179; Boulton et al., (1989) Plant Mol. Biol. 12:31-40.; і Gould et al., (1991) Plant Physiol. 95:426-434.

Альтернативні способи перенесення генів і трансформації як необмежувальні приклади включають трансформацію протопластів за допомогою опосередкованого кальцієм, поліетиленгліколем (PEG) або електропорацією захоплення "голої" ДНК (див. Paszkowski et al. (1984) EMBO J. 3:2717-2722, Potrykus et al. (1985) Molec. Gen. Genet. 199:169-177; Fromm et al. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5824-5828; і Shimamoto (1989) Nature 338:274-276) і електропорації тканин рослин (D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505). Додаткові способи трансформації рослинних клітин включають мікроін'єкцію, опосередковане карбідом кремнію захоплення ДНК (Каерплер et al. (1990) Plant Cell Reporter 9:415-418) і бомбардування мікрочастинками (див. Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309; і Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618) або наночастинками.

Описувані способи і композиції можна використовувати для вставляння екзогенних послідовностей у визначені наперед положення в геномі рослинної клітини. Це є корисним, в зв'язку з тим, що експресія рослини трансгена, що вводиться в геном, критично залежить від його ділянки інтеграції. Таким чином, гени, що кодують, наприклад, поживні речовини, антибіотики або терапевтичні молекули, можна вводити за допомогою направленої рекомбінації в області геномів рослин, прийнятні для їх експресії.

Трансформовані рослинні клітини, що отримуються будь-яким з вказаних вище способів трансформації, можна культивувати з регенерацією цілої рослини, яка має трансформований генотип і, таким чином, бажаний фенотип. Такі способи регенерації основані на маніпуляціях з певними фітогормонами в середовищі для вирощування культур тканин, як правило, основуючись на біоцидному і/або гербіцидному маркері, що вводиться спільно з бажаними нуклеотидними послідовностями. Регенерація рослин з культивованих протопластів описана в Evans, et al., "Protoplasts Isolation and Culture" in Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, Macmillan Publishing Company, New York, 1983; і Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Регенерацію також можна здійснювати з калюсу, тканин, органів, пилка, ембріонів рослин або їх частин. Такі способи регенерації в основному описані в Klee et al. (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486.

Нуклеїнові кислоти, що вводяться в рослинну клітину, можна використовувати для надання бажаних ознак по суті будь-якій рослині. З використанням конструкцій нуклеїнових кислот за даним описом і різних способів трансформації, вказаних вище, можна сконструювати широку множину рослин і систем рослинних клітин з бажаними фізіологічними і агрономічними характеристиками, що описуються в цьому документі. У переважних варіантах здійснення рослини-мішені і рослинні клітини-мішені для конструювання як необмежувальні приклади включають однодольні і дводольні рослини, такі як сільськогосподарські культури, включаючи зернові культури (наприклад, пшеницю, кукурудзу, рис, просо, ячмінь), плодові культури (наприклад, помідор, яблуко, груша, полуниця, апельсин), кормові культури (наприклад, люцерна), коренелюди (наприклад, морква, картопля, цукровий буряк, батат), листові овочеві культури (наприклад, салат-латук, шпинат); квітучі рослини (наприклад, петунія, троянда, хризантема), хвойні і соснові дерева (наприклад, сосна, ялиця, ялина); рослини, що використовуються в фітомедицині (наприклад, рослини, що акумулюють важкі метали); олійні культури (наприклад, соняшник, насіння ріпаку, соя), і рослини, що використовуються в експериментальних цілях (наприклад, Arabidopsis). Таким чином, описувані способи і композиції знаходять застосування для широкого діапазону рослин, включаючи як необмежувальні приклади види родів Asparagus, Avena, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Cucurbita, Daucus, Erigeron, Glycine, Gossypium, Hordeum, Lactuca, Lolium, Lycopersicon, Malus, Manihot, Nicotiana, Orychophragmus, Oryza, Persea, Phaseolus, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Secale, Solarium, Sorghum, Triticum, Vitis, Vigna і Zea.

Фахівцеві в даній галузі зрозуміло, що після стабільного вбудовування експресуючої касети в трансгенні рослини і підтвердження функціонування, її можна вводити в інші рослини за допомогою статевого схрещування. Можна використовувати будь-який зі стандартних способів селекції залежно від схрещуваних видів.

Трансформовані клітини, калюс, тканину рослини або рослину можна ідентифікувати і виділяти за допомогою відбору або скринінгу конструйованого рослинного матеріалу рослин на ознаки, що кодуються маркерними генами, що знаходяться в трансформованій ДНК. Наприклад, відбір можна проводити по росту конструйованого рослинного матеріалу на середовищах, які містять інгібуючу кількість антибіотика або гербіциду, до яких трансформована генна конструкція додає стійкості. Крім того, трансформовані рослини і рослинні клітини також можна ідентифікувати за допомогою скринінгу на активність видимих маркерних генів (наприклад, генів β -глюкуронідази, люциферази, В або С1), які можуть знаходитися на рекомбінантних конструкціях нуклеїнових кислот. Такі способи відбору і скринінгу добре відомі фахівцям в даній галузі.

Також для ідентифікації трансформантів рослин або рослинних клітин, що містять вбудовані генні конструкції, можна використовувати фізичні і біохімічні способи. Ці способи як необмежувальні приклади включають: 1) Саузерн-аналіз або ампліфікацію ПЛР для детекції і визначення структури вставляння рекомбінантної ДНК; 2) Нозерн-блот, захист від РНКазі S1, добудування праймера або ампліфікацію ПЛР із зворотною транскриптазою для детекції і дослідження РНК-транскриптів генних конструкцій; 3) ферментативні аналізи для детекції ферментативної або рибозимної активності, коли генна конструкція кодує такі продукти генів; 4) електрофорез білків в гелі, способи вестерн-блотингу, імунопреципітацію або імуноферментні аналізи, коли продуктами генної конструкції є білки. Для детекції присутності або експресії

рекомбінантної конструкції в конкретних органах і тканинах рослин також можна використовувати додаткові способи, такі як гібридизація *in situ*, ферментне фарбування і імунозabarвлювання. Способи проведення всіх цих аналізів добре відомі фахівцям в даній галузі.

Ефекти маніпуляцій з генами способами, що описуються в цьому документі, можна спостерігати, наприклад, за допомогою нозерн-блотингу РНК (наприклад, мРНК), виділеної з тканин, які представляють інтерес. Як правило, якщо кількість мРНК зростає, можна вважати, що відповідний ендегенний ген експресується більшою мірою, ніж раніше. Можна використовувати інші способи вимірювання активності гена і/або СУР74В. Можна використовувати різні типи ферментативних аналізів залежно від використовуваного субстрату і способу детекції зростання або зниження кількості продукту реакції або побічного продукту. Крім того, можна імунохімічно, тобто за допомогою ELISA, RIA, EIA і інших основаних на антитілах аналізів, добре відомих фахівцям в даній галузі, таких як аналіз за допомогою електрофоретичного визначення (з фарбуванням або з вестерн-блотингом), вимірювати рівні експресованого білка СУР74В. Трансген можна селективно експресувати в певних тканинах або на певних стадіях розвитку рослин, або трансген можна експресувати по суті у всіх тканинах рослин, по суті протягом всьому життєвого циклу. Однак також застосовний будь-який комбінаторний режим експресії.

Даний опис також стосується насіння трансгенних рослин, описаних вище, де насіння містить трансген або генну конструкцію, і включає насіння з бажаними модифікованими профілями олій. Крім того, даний опис стосується потомства, клонів, клітинних ліній або клітин трансгенних рослин, описаних вище, де вказане потомство, клон, клітинна лінія або клітина містять трансген або генну конструкцію.

Введення ефективних кількостей проводять будь-якими маршрутами, що звичайно використовуються для приведення ZFP в максимальний контакт з оброблюваною рослинною кліткою. ZFP вводять будь-яким відповідним способом, переважно з прийнятними носіями. Відповідні способи введення таких модуляторів є доступними і добре відомі фахівцям в даній галузі, і, хоч для введення конкретної композиції можна використовувати більше одного маршруту, конкретний маршрут часто забезпечує більш швидку і більш ефективну реакцію, ніж інший маршрут.

Також можна використовувати носії і їх частково визначає конкретна композиція, що вводиться, а також конкретний спосіб, що застосовується для введення композиції. Таким чином, існує широка множина доступних відповідних складів композицій.

Застосування

Як вказано вище, направлену модуляцію генів, залучених до синтезу жирних кислот, можна використовувати для швидкого і ефективного отримання рослинних олій з бажаним профілем жирних кислот.

Зміна складу жирних кислот рослинних олій олієпродукуючих рослин, наприклад, таких як канولا, має принципове значення для харчового виробництва і, таким чином, для здорової дієти. Наприклад, олійне насіння сортів Brassica якості канולי зі зниженими рівнями насичених жирних кислот в олії насіння можна використовувати для отримання харчових продуктів, які сприяють здоров'ю серцево-судинної системи. Способи і композиції, що описуються в цьому документі, можна використовувати для отримання олієпродукуючих рослин з низьким вмістом пальмітинової і/або стеаринової кислот, який знижує рівні насичених жирних кислот в рослинній олії. Подібним чином, отримання олієпродукуючих рослин із збільшеними рівнями вмісту олеїнової кислоти також знижує кількість насичених жирних кислот в рослинній олії.

Крім того, способи і композиції, що описуються в цьому документі, можна використовувати для збільшення вмісту пальмітинової кислоти, наприклад, в оліях, що отримуються з таких рослин. Олії з високим вмістом пальмітинової кислоти особливо придатні в складі маргаринів.

Крім того, направлену зміну профілів жирних кислот, як описано в цьому документі, можна використовувати для отримання рослин (і рослинних олій) з низьким вмістом ліноленової кислоти. Олії з низьким вмістом ліноленової кислоти демонструють підвищену стабільність; харчові продукти, що отримуються з використанням цих олій, не псуються відносно аромату або запаху так швидко, як продукти, що отримуються з рослинних матеріалів з високими концентраціями ліноленової кислоти.

Приклади

Нижче надані приклади конкретних варіантів здійснення для здійснення даного опису. Приклади надані виключно з ілюстративними цілями і не призначені для обмеження об'єму даного опису яким би то не було чином.

Виконані зусилля для забезпечення точності відносно використовуваних чисел (наприклад, кількостей, температур і т. д.), але, зрозуміло, потрібно допускати деякі експериментальні помилки і відхилення.

Приклад 1: Ідентифікація послідовностей-мішеней в *Brassica napus* L

5 1.1 Ідентифікація послідовності-мішені

У цьому прикладі ідентифіковані ендегенні послідовності ДНК, що кодують фермент β -кетואцил-АСР-синтетази II (KAS II), що знаходяться у *Brassica napus* L (канола) в природі. Ці гени вибирали як ілюстративну мішень для демонстрації регуляції транскрипції за допомогою конструйованих факторів транскрипції білками з цинковими пальцями (ZFP TF), що приводить до бажаної модифікації біосинтезу жирних кислот і одночасно змінених профілів в олії насіння. Фермент β -кетואцил-АСР-синтетази II каталізує перетворення 16:0-АСР в 18:0-АСР і подальше утворення олеїнової кислоти (Ohlrogge and Browse, 1995, *The Plant Cell*, 7:957-970). Описаний мутант гена β -кетואцил-АСР-синтетази II *Arabidopsis thaliana* fab1 приводив до 65 % зниження активності ферменту і одночасного збільшення вмісту стеаринової кислоти на 7 % і 3 % в листі і корінні, відповідно (Wu et al., 1994, *Plant Physiology*, 106:143-150). Стабільна експресія трансформованого трансгена β -кетואцил-АСР-синтетази II сої в канолі знижувала вміст пальмітинової кислоти в насінні на 0,8 %, а введення того ж гена в тютюн знижувало вміст пальмітинової кислоти на 2 % (патентна публікація Японії № 501446/1995).

Описані послідовності кДНК β -кетואцил-АСР-синтетази II з множини видів рослин, включаючи *Arabidopsis thaliana* (GenBank: AF318307) і *Brassica napus* (GenBank: AF244520). Вирівнювання послідовностей кДНК *A. thaliana* і *B. napus* (GenBank: AF318307 і AF244520, відповідно) продемонструвало, що послідовність AF244520 була неповною (фігура 7). У цій укороченій послідовності ДНК *B. napus* було відсутньо декілька сотень пар основ на 5'-кінці. Крім того, оскільки *B. napus* являє собою амфідиплоїдний вид, що є результатом комбінації наборів хромосом *B. gara* (2n=20, AA) і *B. oleracea* (2n=18, CC) (Morinaga, 1934, *Cytologia*, 6:62-67; U.N., 1935, *Japanese J. Bot.*, 7:389-452), передбачають, в цьому виді може існувати більше одного гена β -кетואцил-АСР-синтетази II. Ідентифіковані і отримані додаткові послідовності 5'-UTR, що знаходяться в послідовностях кДНК. Ці 5'-послідовності генів β -кетואцил-АСР-синтетази II в даних прикладах служили як мішені для активації транскрипції за допомогою ZFP-TF.

30 1.2 Виділення тотальної РНК

Тотальну РНК виділяли з незрілого насіння *Brassica napus* (канола) з генотипом Nex710 (Crop Certificate 99-7049208-501) через 15 діб після цвітіння (DAF) з використанням набору Qiagen's RNEASYo PLANT MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA). Тотальну мРНК обробляли ДНКазою, яка не містить РНКаз, відповідно до рекомендацій виробника для видалення будь-яких контамінуючих ДНК, які можуть ампліфікуватися при кількісній ПЛР-РЧ.

35 1.3 5' RACE і аналіз послідовностей

Швидку ампліфікацію кінців кДНК (RACE), специфічну для 5'-кінця кДНК β -кетואцил-АСР-синтетази II *B. napus* (GenBank AF244520), проводили з використанням набору FIRSTCHOICE® RLM-RACE з Ambion (Ambion, Austin, TX) по рекомендаціях виробника. Для отримання 5'-кінця послідовності кДНК, з некепованою 5'-областю мРНК випалювали синтетичний РНК-адаптор. Праймер, що поставляється з набором (5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA-3') (SEQ ID NO:1), і другий праймер (5'-CTCGAGCTGCTACTGCTAGTTCCGGTGGAGGAGCC-3') (SEQ ID NO:2), які складені для зв'язування всередині часткової послідовності кДНК *B. napus* (GenBank AF244520), використовували для ампліфікації фрагмента для визначення невідомої розташованої вище послідовності. За допомогою ампліфікації 5' RACE ідентифікували приблизно 500 пар основ нових послідовностей *B. napus*. При вирівнюванні ампліфікованих послідовностей ідентифіковані контиги чотирьох виразно розрізняваних 5'-послідовностей кДНК генів β -кетואцил-АСР-синтетази II (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:46 і SEQ ID NO:30) (фігура 8). Ці 5'-послідовності продемонстрували високі рівні гомології з послідовностями *B. gara* (GenBank: AC 189461) і *B. oleracea* (GenBank: BH723504) з тієї ж області.

У 5'-послідовностях кДНК генів β -кетואцил-АСР-синтетази II ідентифікували зв'язування послідовностей ZFP TF. Як мішені для зв'язування ZFP TF (таблиця 1) служили послідовності з розташованої вище генів β -кетואцил-АСР-синтетази II області (таблиця 2). Конструкції плазмід: pDAB4695, pDAB4696, pDAB4697 і pDAB4698, що містять конструйовані склади ZFP TF, застосовували для стабільної трансформації *B. napus*, як описано в наступних розділах. Передбачали, що конструйовані ZFP TF після експресії в рослинних клітинах будуть зв'язуватися з ендегенними мішенями β -кетואцил-АСР-синтетази II, приводячи до модифікованої експресії мРНК мішені.

Приклад 2: Конструювання ДНК-зв'язувальних доменів ZFP, специфічних до гена β -кетацил-АCP-синтетази II

- 5 Конструювали білки з цинковими пальцями до різних ділянок-мішеней області промотору і 5'-нетрансльованої і трансльованої області гена β -кетацил-АCP-синтетази II В. парус. Див., фігуру 2. Розпізнавальні спіралі для характерних конструкцій ZFP представлені нижче в таблиці 1. Ділянок-мішені для конструкцій цинкових пальців представлені нижче в таблиці 2.

Таблиця 1

Конструкції цинкових пальців для β -кетацил-АCP-синтетази II

ZFP	F1	F2	F3	F4	F5	F6
14025	RSDNLSV (SEQ ID NO:5)	QKINLQV (SEQ ID NO:6)	RSDDLSE (SEQ ID NO:7)	TRSSRIN (SEQ ID NO:8)	RSDALAR (SEQ ID NO:9)	н/д
14033	RSDHLSA (SEQ ID NO:10)	TSSSRIN (SEQ ID NO:11)	RSDNLAR (SEQ ID NO:12)	DRSHLAR (SEQ ID NO:13)	RSDNLSE (SEQ ID NO:14)	RNAHRT T (SEQ ID NO: 15)
14035	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	RSDHLSE (SEQ ID NO:17)	QKANRT K (SEQ ID NO:18)	RSDDLTR (SEQ ID NO:19)	TSANLSR (SEQ ID NO:20)	н/д
14047	RSDDLK (SEQ ID NO:21)	RSANLTR (SEQ ID NO:22)	RSDDLTR (SEQ ID NO:19)	RSDHLSE (SEQ ID NO:17)	DKSNRK K (SEQ ID NO:23)	н/д

Таблиця 2

Ділянки-мішені β -кетацил-АCP-синтетази II для цинкових пальців

ZFP	Ділянка-мішень (від 5' до 3')	Мішень ZFP/SEQ ID No., де знаходиться ділянка зв'язування
14025	cGTGGAGACGtCAAAAGa (SEQ ID NO:24)	3, 4, 46 і 30
14033	aAGGAAGGGCGAGAAAAGGg (SEQ ID NO:25)	3 і 4
14035	aGATGCGTAACAGGAAG (SEQ ID NO:26)	3, 4, 46 і 30
14047	cTACCGGGCGGAGTCGt (SEQ ID NO:27)	3, 4 і 30

- 10 Конструкції з β -кетацил-АCP-синтетази II вбудовували в експресуючі цинкові пальці вектори, що кодують білок щонайменше з одним пальцем зі структурою CCHC. Див., патентну публікацію США № 2008/0182332. Зокрема, останній палець в кожному білку мав структуру (будову) CCHC.

- 15 Потім кодуєчі послідовності цинкових пальців зливали з послідовностями, що кодують активуючий домен VP16 і сигнал ядерної локалізації ораque-2. Експресію злитих білків вміщували під контроль відносно сильного конститутивного промотору, такого як промотор, який походить з промотору убіквітину 10 *Arabidopsis thaliana* (AtUbi10). Ілюстративні вектори приведені в таблиці 3 нижче.

- 20 Приклад 3: Опосередковане ZFP TF підвищення експресії природного гена(ів) β -кетацил-АCP-синтетази II В. парус

- 25 Для оцінки функціональності складених білків з цинковими пальцями в рослинних клітинах використовували способи експресії таких білків в живих рослинних клітинах. ДНК, що кодують білки з цинковими пальцями, можна доставляти в рослинні клітини в умовах, коли ДНК не вбудована в геном рослинної клітини. Таким чином, молекула ДНК транзитивно присутня в рослинних клітинах і діє як матриця для експресії генів. Альтернативно, ДНК, що кодують білки з цинковими пальцями, можна доставляти в рослинні клітини в умовах, що забезпечують вбудовування ДНК в геном рослинної клітини, що приводить до трансгенезу генів, що кодують білки з цинковими пальцями так, що молекула ДНК стабільно присутня в рослинних клітинах і діє як матриця для експресії генів. Для оцінки функціональності білків з цинковими пальцями в живих рослинних клітинах фахівець в даній галузі може використовувати транзиторну або трансенну експресію ДНК, що кодують ці білки.

3.1 Складання конструкцій

Бінарні плазмідні, складені і сконструйовані для цього проекту, перераховані в таблиці 3.

Таблиця 3

Опис конструкцій для ZFP TF, направлених на KAS II B. napus

S.N.	ZFP	№ конструкції	Касета генів
1	14025	pDAB4695	Atubi10/ZFP1- Vp16/AtuORF23/CsVMV/pat/AtuORF1
2	14033	pDAB4696	Atubi10/ZFP2- Vp16/AtuORF23/CsVMV/pat/AtuORF1
3	14035	pDAB4697	Atubi10/ZFP3- Vp16/AtuORF23/CsVMV/pat/AtuORF1
4	14047	pDAB4698	Atubi10/ZFP4- Vp16/AtuORF23/Cs VMV/pat/AtuORV1

Atubi10 = промотор убіквітину 10 *Arabidopsis thaliana*, CsVMV = промотор вірусу мозаїки жилок маніоки, ZFP = ген білка з цинковими пальцями, pat = ген фосфінотрицинацетилтрансферази, AtuORF1=3'-UTR 1 *Agrobacterium tumefaciens* і AtuORF23=3'-UTR 23 *Agrobacterium tumefaciens*.

- 5 pDAB4695 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети 14025 v3/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7 (область прикріплення до матриксу (Thompson et al., 1997, WO9727207)):v2 промотору AtUbi10 (промотор убіквітину 10 *Arabidopsis thaliana* (Callis, et al., 1990, J. Biol. Chem. 265-12486-12493)):злиття v3 цинкового пальця 14025/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu (3'-нетрансльована область відкритої рамки зчитування 23 *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin et al., 1987, EP222493)):v2 промотору CsVMV (промотор вірусу мозаїки жилок маніоки (Verdaguer et al., 1996, Plant Molecular Biology 31:1129-1139)):v5 pat (фосфінотрицинацетилтрансфераза (Wohlleben et al., 1988, Gene 70:25-37)):v4 3'-UTR AtuORF1 (3'-нетрансльована область відкритої рамки зчитування 1 *Agrobacterium tumefaciens* (Huang et al., J. Bacteriol. 172:1814-1822)). Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття v3 цинкового пальця 14025/VP16, в pDAB3916 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку позначали як pDAB8221, містила генну експресійну касету v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14025/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu. pDAB8221 клонували в бінарну плазмиду pDAB7309 за допомогою реакції L-R Gateway® Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У даній реакції отримували pDAB4695 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.
- 10 pDAB4696 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети v3 14033/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14033/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu:v2 промотору CsVMV:pat v5:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття v3 цинкового пальця 14033/VP16, в pDAB3916 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку позначали як pDAB8222, містила генну експресійну касету v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14033/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu. pDAB8222 клонували в бінарну плазмиду pDAB7309 за допомогою реакції L-R Gateway® Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У даній реакції отримували pDAB4696 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.
- 15 pDAB4697 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети v3 14035/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14035/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu:v2 промотору CsVMV:pat v5:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття v3 цинкового пальця 14035/VP16, в pDAB3916 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку позначали як pDAB8223, містила генну експресійну касету v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14035/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu. pDAB8223 клонували в бінарну плазмиду pDAB7309 за допомогою реакції L-R Gateway® Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У даній реакції отримували pDAB4697 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.
- 20 pDAB4698 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети v3 14047/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:v2 промотору

AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14047/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu:v2 промотору CsVMV:pat v5:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття v3 цинкового пальця 14047/VP16, в pDAB3916 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку позначали як pDAB8224, містила генну експресійну касету v2 промотору AtUbi10:злиття v3 цинкового пальця 14047/VP16:v1 3'-UTR ORF23 Atu. pDAB8224 клонували в бінарну плазмиду pDAB7309 за допомогою реакції L-R Gateway® Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У даній реакції отримували pDAB4698 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

3.2 Трансформація *Agrobacterium*

Клітини *Agrobacterium* отримували для електропорації з використанням протоколу, описаного в Weigel D., Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: стор. 123-124. У протоколі проводили незначні модифікації, що забезпечують оптимальний ріст *Agrobacterium* (тобто середовище YEP замінювали на LB). У 50 мкл клітин *Agrobacterium tumefaciens* C58:Z707s незалежно додавали 1,5-3 мкг плазмідної ДНК для кожної конструкції і обережно змішували. Суміш переносили в холодні 0,2 см кювети GENE PULSER® (BioRad Hercules, CA) і вміщували на лід. Потім кювети вміщували в холодний штатив GENE PULSER® (BioRad, Hercules, CA) і піддавали електропорації при наступних умовах: вихідна місткість 25 мкФарад, ємнісний компенсатор - 960 мкФ, опір - 200 Ом і напруга - 2,5 кВ. Відразу після електропорації додавали 950 мкл середовища SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA) і суміш переносили в пробірку Falcon 2059 (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) або еквівалент. Потім трансформовані клітини інкубували при 28 °C протягом 1 години. Після інкубації 50 мкл, 100 мкл і 200 мкл клітин висівали на окремі чашки із середовищем YEP (10 г дріжджового екстракту, 10 г пептону, 5 г NaCl, 10 г сахарози і 15 г агару в 1 літрі води), яка при необхідності містить антибіотики. Вирощування проводили в обернених чашках при 28 °C приблизно протягом 36-48 годин. Окремі колонії прожарювали і вирощували в 50 мл рідкого YEP (10 г дріжджового екстракту, 10 г пептону, 5 г NaCl і 10 г сахарози в 1 літрі води), що містить при необхідності антибіотики, при 28 °C приблизно протягом 36 годин.

Штам *Agrobacterium tumefaciens* підтверджували кетолактозним тестом. Приблизно трансформовані колонії штрихами наносили на агар з лактозою і інкубували при 28 °C протягом 48 годин. Потім чашки заповнювали розчином Бенедикта. Проводили спостереження за чашками; нанесені штрихами ізоляти, що перетворюють розчин Бенедикта з синього в жовтий, підтверджували як *Agrobacterium* (Bouzar, H., Jones, J., Bishop, A. "Simple Cultural Tests for Identification of *Agrobacterium* Biovars". *Methods in Molecular Biology*, Volume 44. Humana Press, 1995: 9-13).

Після проведення протоколу QIAGEN® low copy mini-prep (Qiagen, Valencia, CA) отримували очищену плазмідну ДНК з бактерійних культур. Цілісність ДНК оцінювали за допомогою рестрикційних фрагментів. Ідентифікували клони з очікуваним малюнком смуг і отримували маточні розчини з гліцерином, додаючи 500 мкл бактерійної культури в 500 мкл стерильного гліцерину (Sigma Co., St. Louis, MO) і перевертаючи для перемішування. Маточні розчини з гліцерином заморожували на сухому льоду і зберігали при -80 °C.

3.3 Трансформація ZFP TF *B. napus*

Отримання гіпокотильних сегментів: поверхню насіння *B. napus* генотипу Nex 710 стерилізували 10 % комерційним відбілювачем протягом 10 хвилин і 3 рази промивали стерильною дистильованою водою. Насіння сушили стерильною паперовою серветкою, потім вміщували в Phyta-tray, що містить "середовище для проростання", що складається з мінімального середовища MS половинної концентрації (Murashige and Skoog, *Physiol Plant* 15(3): 473-497, 1962), 20 г/л сахарози і 8 г/л агару TC (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS), і підтримували в умовах режиму вирощування при 23 °C і зі світловим періодом 16 год. світла/8 год. темряви.

На 5 добу сходи перевіряли на стерильність, Phyta-tray вміщували у витяжну шафу з ламінарним потоком EDGE GARD® (The Baker Company, Sanford, ME) для підтримки стерильності. Використовуючи стерильний пінцет і анатомічні ножиці, рослини видаляли з Phyta-tray і надземні області (меристему і сім'ядолю) і коріння відділяли і відкидали. Гіпокотилі вміщували в чашку Петрі 100×25 мм, що містить стерильну дистильовану воду, необхідну для запобігання висушуванню. Гіпокотилі вміщували на кришку чашки Петрі 100×25 мм і нарізали в поперечному напрямку на 3-мм сегменти з використанням скальпеля № 10. Сегменти гіпокотилів вміщували на "середовище для індукції калюсу", що складалося з середовища MS, що містить 30 г/л сахарози, 1 мг/л кінетину і 1 мг/л 2,4-D, яка отверджена 7 г/л агару TC, що містить стерильний фільтрувальний папір. Чашки вміщували в чисту ванну STERILITE® і підтримували при тому ж режимі вирощування протягом 3 діб, як попередньої обробки.

Потім на доби 8 сегменти переносили в стерильні чашки Петрі 100×25, які містять 20 мл "рідкого середовища для культивування", що складається з мінімального середовища Лінсмайера і Скуга (1965), що містить 30 г/л глюкози, вітаміни половинної концентрації Gamborg (1968), 215,2 мг/л кінетину і 221,04 мг/л 2,4-D для попередньої обробки протягом 1 години.

"Рідке середовище для культивування" з гіпокотильних сегментів видаляли і 40 мл суспензії *Agrobacterium* (яка містить pDAB4695, pDAB4696, pDAB4697 або pDAB4698 в Z707s) короткочасно перемішували на "центрифузі вортекс" 50 Klett і наливали в чашку Петрі 100×25 мм, що містить гіпокотильні сегменти для обробки протягом 30 хвилин. Через 30 хвилин всю суспензію *Agrobacterium* видаляли з використанням подвійної зістикованої піпетки. Оброблені гіпокотилі вміщували назад на "середовище для індукції калюсу" з фільтрувальним папером, повертали у ванну STERILITE®, накривали темною кришкою і повертали в приміщення для культивування при тому ж режимі вирощування, як указано вище, на 3 доби періоду спільного культивування. Через 3 доби гіпокотилі вміщували безпосередньо на "середовище для індукції калюсу", що містить 1 мг/л HERBIACE®, вміщували назад у ванну з прозорою кришкою і повертали в приміщення для культивування, підтримуючи той же режим вирощування, як указано вище. Через 1 тиждень гіпокотилі переносили безпосередньо в "середовище для індукції калюсу" з відбором на 3 мг/л HERBIACE® протягом 2 тижнів для додаткового розвитку калюсу і переносили в "середовище для індукції калюсу" з відбором на 5 мг/л HERBIACE® протягом 2-8 тижнів для додаткового розвитку калюсу. Після отримання достатньої кількості калюсу, його піддавали молекулярному аналізу.

Регенерація рослин з витриманого калюсу каноли: тканину калюс каноли вміщували на "середовище для регенерації втеч", що складається з середовища MS, що містить 30 г/л сахарози, 3 мг/л бензиламінопурина, 0,5 г/л MES [2-(N-морфоліон)етансульфонової кислоти], 5 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л зеатину, 250 мг/л карбеніциліну, 300 мг/л тиментину і 7 г/л агару TC з відбором на 5 мг/л HERBIACE®, чашки обертати стрічкою 3M і вміщували в умови режиму вирощування при 23 °C і зі світловим періодом 16 год. світла/8 год. темряви. Потім тканини вміщували в "середовище для росту паростків", що складається з середовища MS, що містить 0,5 г/л MES, 300 мг/л тиментину, 20 г/л сахарози і 7 г/л агару TC з відбором на 5 мг/л HERBIACE®. Паростки переносили на "середовище для вкорінення", що складається з середовища MS половинної концентрації, що містить 10 г/л сахарози, 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти, 300 мг/л тиментину і 8 г/л агару TC з відбором на 5 мг/л HERBIACE®.

Після розвитку на паростках коріння *in vitro*, їх пересаджували в горщики 13,34 см, що містять суміш Metro Mix 360. Кожну з рослин накривали прозорим окремим ковпаком і вміщували в Conviron для акліматизації. Через 48-72 годин ковпаки видаляли для забезпечення циркуляції повітря. Через сім діб горщики переміщували з Conviron в тепличний лоток для подальшого розвитку. Рослини вирощували зі світловим періодом 16:8 годин, з денною і нічною температурою 22-24 °C. Після початку подовження первинного квіткового стебла і формування квіткових бутонів, всю рослину закривали мішком для самозапилення для запобігання ауткросингу. Насіння, що отримується при самозапиленні, збирали приблизно через чотири місяці після пересадження.

Отримання *Agrobacterium*: *Agrobacterium* з маточного розчину в гліцерині за четверо діб перед обробкою штрихами наносили на "напівтверде середовище для вирощування бактерій", що складається з 10 г/л пептону, 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl, 10 г/л сахарози і 100 мг/л спектиноміцину і 250 мг/л стрептоміцину і отвердженого 15 г/л агару Bacto, і вирощували протягом двох діб в інкубаторі (Fisher Scientific Isotemp Incubator) при 28 °C. Через 2 доби невелику петлю *Agrobacterium* вміщували в 500 мл стерильну одноразову колбу з відбивачами, яка містить 150 мл "рідкого середовища для вирощування бактерій" (таке ж, як указано вище, але без стверджувального засобу), 250 мг/л стрептоміцину і 100 мг/л спектиноміцину, вирощували протягом 16 годин протягом ночі при 28 °C в темряві на закритому шейкері (шейкер з охолодженням інкубатором New Brunswick Scientific Innova 4330) при 200 об./хв. Через 16 годин культуру *Agrobacterium* виймали з шейкера і вміщували аліквоти в 50-мл центрифугальні пробірки (одну, яка містить 35 мл для отримання, і дві, що містить 50 мл, для повторного підтвердження). Центрифугальні пробірки вміщують в центрифугу (центрифуга Beckman Model J2-21) і центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хвилин, а потім ресуспендують в "рідкому середовищі для культивування" до кінцевої густини Klett 50 з червоним фільтром.

Приклад 4: Аналіз трансформованих зразків калюсу

Приблизно трансформовані зразки калюсу *B. napus* аналізували на зміни експресії мРНК ендогенного гена β-кетоацил-ACP-синтетази II, ендогенного гена тубуліну і трансгена ZFP TF. Рівні мРНК тубуліну використовували як внутрішній контроль для нормалізації експресії мРНК ZFP TF і β-кетоацил-ACP-синтетази II. Дані про експресію мРНК ZFP TF використовували для

підтвердження присутності в трансформованих калюсах щонайменше одного функціонального трансгена ZFP TF.

4.1 Отримання зразків калюсу

Після трансформації тканини гіпокотилу *Nex710* отримували приблизно 40-50 зразків калюсу *B. napus* у віці восьми тижнів. Їх індивідуально трансформували конструкціями ZFP TF, pDAB4695, pDAB4696, pDAB4697 і pDAB4698, як описано вище в прикладі 3.3. Контрольні зразки отримували за допомогою трансформації контрольною бінарною конструкцією, що містить генну експресійну касету *pat* (*v2* промотору *AtUbi10:pat v3:v3 3'-UTR ORF1 Atu*). Всі зразки до їх збору вирощували в доповненому HERBIACE середовищі для культивування клітин.

Зі свіжої тканини калюсу отримували тотальну РНК з використанням набору QIAGEN RNEASY 96 Kit (Qiagen, Valencia, CA). РНК обробляли ДНКазою, яка не містить РНКаз, по інструкціях до набору для видалення будь-якої контамінуючої геномної ДНК. Синтез першого ланцюга проводили по інструкціях виробника ферменту зворотної транскриптази Superscript® III (Invitrogen, Carlsbad, CA), а як праймери використовували випадкові гексамери. Синтезовані ланцюги кДНК розбавляли водою до відношень 1:10 і 1:50 (вони забезпечували достатню кількість матриці для ампліфікації декількох мішеней за допомогою ПЛР). Кожну аліквоту зберігали при -20 °C на невизначений термін.

4.2 Аналіз експресії мРНК β-кетоацил-ACP-синтетази II

Реакційні суміші кПЛР-РЧ складали для ампліфікації кДНК β-кетоацил-ACP-синтетази II таким чином: 7,5 мкл 2X основного буфера LC480 Probes Master Buffer (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину геноспецифічного прямого праймера (SEQ ID NO:28: 5'-TTGACTCGAGCTGCTACTGC-3'; положення нуклеотидів 544-563 для SEQ ID NO:3 на вирівнюванні на фігурі 8), 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину геноспецифічного зворотного праймера (SEQ ID NO:29: 5'-TTTCCATATCCATCGCAACA-3'; положення нуклеотидів 588-607 для SEQ ID NO:3 на вирівнюванні на фігурі 8), 0,15 мкл зонди UPL №25 з LIGHTCYCLER® 480 Probes Master (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 1,5 мкл 10 % (мас/об.) полівінілпіролідону-40 (PVP-40) і 3,9 мкл води. Зонд UPL (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) являє собою закрити нуклеїнову кислоту і, таким чином, має більш високу T_m , ніж розрахована в інших випадках. Перед обробкою стандартів і невідомих проб всі компоненти вміщували в морозильник. Розмічали і маркували 384-ямковий мікропланшет, додавали 13,5 мкл основної суміші на ямку. До мікропланшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугі для мікропланшетів Qiagen. Додавали 1,5 мкл розморожених розведених синтезованих ланцюгів кДНК. Крім того, в окрему ямку додавали 1,5 мкл стандартів кількості піків, додавали плазмідну ДНК в ряді розведень від найменших до найбільших концентрацій, ці стандарти порівнювали з кДНК β-кетоацил-ACP-синтетази II (синтезованою з тотальної мРНК) з кількісним підрахунком кількості піків. Отримували ряд стандартів кількості піків ДНК β-кетоацил-ACP-синтетази II за допомогою клонування амплікона-мішені в плазміді pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) і отримуючи ряд розведень для кількісного визначення кількості піків. До планшета міцно прикріплювали герметизуючу покривку з фольгою і центрифугували, як описано раніше. Програму ПЛР проводили таким чином: i. активація при 95 °C протягом 5 хвилин; ii. денатурація при 95 °C протягом 10 сек... @ 4,8 °C/сек.; iii. відпал/елонгація при 60 °C протягом 25 сек... @ 2,5 °C/сек...; iv. добудування при 72 °C протягом 1 сек... @ 4,8 °C/сек...; повторення етапів ii-iv ще 40-50 разів; охолодження до 38 °C протягом 5 сек... ДНК ампліфікували в пристрої для ПЛР з детекцією в реальному часі LC480 (Roche, Indianapolis, IN) або еквівалентному. Розмір амплікона становив 64 пари основ. Використовувані в цьому аналізі ПЛР послідовності прямого і зворотного праймерів точно співпадали з відповідними послідовностями, що знаходяться в двох генах-мішенях β-кетоацил-ACP-синтетази II, SEQ ID NO:3 і 30 (фігура 8). Таким чином, цей аналіз являє собою кількісне визначення експресії двох генів-мішеней β-кетоацил-ACP-синтетази II.

4.3 Аналіз експресії мРНК тубуліну

Ген тубуліну, природний ген *Brassica napus* (GenBank: AF258790 і GenBank: DU106489), використовували як еталонний стандарт для точної нормалізації сигналу експресії мРНК у всіх генах в аналізах кПЛР-РЧ. кДНК, синтезовану для аналізу кПЛР-РЧ β-кетоацил-ACP-синтетази II (описаного в прикладі 4.1), також використовували в аналізі кПЛР-РЧ тубуліну, як описано нижче.

кПЛР-РЧ для детекції і кількісного визначення ДНК складали з 0,3 мкл геноспецифічного прямого праймера (SEQ ID NO:31: 5'-ACAGCGATTGCCTACAAGG-3') (10 мкМ маточний розчин) і 0,3 мкл геноспецифічного зворотного праймера (SEQ ID NO:32: 5'-AGATGGTTAAGATCACCAAGG-3') (10 мкМ маточний розчин), 1,5 мкл 10 % (мас/об.) PVP-40,

3,9 мкл води і 7,5 мкл 2X основної суміші LIGHTCYCLER® 480 SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN). Маркували і позначали 384-ямковий мікропланшет, додавали 13,5 мкл основної суміші на ямку. До мікропланшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугі для мікропланшетів Qiagen.

5 Герметизуючу фольгу видаляли і додавали 1,5 мкл розморожених розведених синтезованих ланцюгів кДНК. Крім того, в окремі ямки додавали 1,5 мкл стандартів кількості піків, додавали плазмідної ДНК серед розведення від найменших до найбільших концентрацій, ці стандарти порівнювали з кДНК тубуліну (синтезованої з тотальної мРНК) з кількісним підрахунком кількості піків. Отримували ряд стандартів кількості піків ДНК тубуліну за допомогою клонування

10 амплікона-мішені в плазміді pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) і отримуючи ряд розведень для кількісного визначення кількості піків. До планшета міцно прикріплювали герметизуючу кришку з фольгою і центрифугували, як описано раніше. Програму ПЛР проводили таким чином: і. активація при 95 °C протягом 10 хвилин; ii. денатурація при 95 °C протягом 10 сек... @ 4,8 °C/сек...; iii. відпал/елонгація при 55,5 °C протягом 20 сек... @ 2,5 °C/сек...; iv. добудування

15 при 72 °C протягом 20 сек... @ 4,8 °C/сек...; повторення етапів ii-iv ще 39 разів; vi. охолодження до 38 °C протягом 5 сек... ДНК ампліфікували в пристрої для ПЛР з детекцією в реальному часі LC480 або еквівалентному. У цій реакції ампліфікували амплікон довжиною 307 пар основ. Зворотний праймер для цієї реакції перекидає інтрон довжиною 78 п.н. на основі послідовності GenBank. Таким чином, амплікони, які ампліфікуються з геномної ДНК, не будуть переважними, і контаміанти геномної ДНК будуть більшої молекулярної маси і їх можна легко диференціювати від ампліконів кДНК, за допомогою запуску ампліконів на агарозному гелі.

4.4 Аналіз експресії мРНК ZFP TF

Експресію мРНК ZFP TF кількісно визначали в зразках кДНК, які початково синтезували для мРНК β-кетоацил-АСР-синтетази II (описаної в прикладі 4.1). Аналіз ПЛР TaqMan планували на основі касети ZFP з використанням якірних праймерів до послідовності NLS ораque-2 на 5'-кінці і послідовності VP16 на 3'-кінці. Аналіз ПЛР складали з використанням: 0,5 мкл 10 мкМ маточного розчину прямого праймера "OP2_NLS_F1" (SEQ ID NO:33: 5'-AAGGAAGAGGAAGGAGTCTAACAG-3'), 0,5 мкл 10 мкМ маточного розчину зворотного праймера "VP16_R1" (SEQ ID NO:34: 5'-CTTCTGCTCTCCACCGTA-3'), 0,25 мкл 5 мкМ маточного

25 розчину зонда "VP16_MGB_185" (SEQ ID NO:45: 5'-TTGATGGTGAAGATGT-3'), 1,5 мкл 10 % (мас/об.) PVP-40, 1,5 мкл 10x буфера для ПЛР з гарячим стартом, 1,0 мкл 25 мМ MgCl₂, 1,2 мкл dNTP (2,5 мМ кожного), 0,15 мкл полімерази Hot Start Taq Polymerase (Qiagen, Valencia, CA) і 6,9 мкл води. Суміш ампліфікували з використанням LIGHTCYCLER® 480 (Roche Diagnostics, USA). Розмічали і маркували 384-ямковий мікропланшет, додавали 13,5 мкл основної суміші на ямку.

30 До мікропланшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугі для мікропланшетів Qiagen. Герметизуючу фольгу видаляли і додавали 1,5 мкл розморожених розведених синтезованих ланцюгів кДНК. До планшета міцно прикріплювали герметизуючу кришку з фольгою і центрифугували, як описано раніше. Програму ПЛР проводили таким чином: і. активація при 95 °C протягом 15 хвилин; ii. денатурація при 95 °C протягом 20 сек. @ 4,8 °C/сек.; iii. відпал/елонгація при 60 °C протягом 20 сек. @ 2,5 °C/сек.; iv. добудування при 72 °C протягом 55 сек. @ 4,8 °C/сек.; повторення етапів ii-iv ще 44 рази; vi охолодження до 38 °C протягом 5 сек. ДНК ампліфікували в пристрої для ПЛР з детекцією в реальному часі LC480 або еквівалентному.

40 Розмір амплікона становив 775 пар основ. Кількість піків кДНК/мРНК ZFP TF визначали з використанням ряду стандартів, в яких амплікон-мішень клонували в плазміді і проводили ряд розведення для аналізів ПЛР, як описано для прикладів β-кетоацил-АСР-синтетази II і тубуліну, вище.

4.5 Аналіз експресії зразків калюсу

Експресію мРНК ZFP TF вимірювали в зразках трансгенного калюсу у віці 8 тижнів

50 приблизно трансформованих ZFP TF і вирощуваних на селективному середовищі HERBIACE® (див. приклад 3). Присутність певної кількості експресованої мРНК ZFP TF, як вимірювали за допомогою аналізу кПЛР-РЧ, детектували в зразках, трансформованих тільки конструкціями, які містять ZFP TF, але не в зразках, що містять контрольну конструкцію. Ці дані свідчать, що аналіз був специфічний для експресії ZFP TF, і що контрольні калюси не містять трансгена ZFP TF.

Для виявлення відмінностей в експресії в зразках калюсу на основі результатів кПЛР-РЧ розраховували відношення експресії мРНК β-кетоацил-АСР-синтетази II і тубуліну. Найбільше підвищення експресії мРНК β-кетоацил-АСР-синтетази II спостерігали в зразках калюсу каноли, трансформованих конструкцією rDAB4695 (таблиця 4). Це 27 % підвищення експресії було статистично значимим (p=0,05) відносно контрольних зразків.

60

Таблиця 4

Експресія мРНК KASII в зразках калюсу *B. napus*, трансформованих різними конструкціями ZFP TF

Конструкція	Кількість аналізованих калюсів	Середнє відношення експресії KasII/тубуліну	STDEV відношення експресії KasII/тубуліну
4695	23	3,69	1,20
4696	20	2,81	0,84
4697	24	3,18	0,93
4698	24	3,03	0,68
Контроль	14	2,90	1,12

Приклад 5: Аналіз зразків трансформованих рослин T_0

5.1 Аналіз експресії мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II, тубуліну і ZFP TF Рослини каноли T_0 , що містять трансгенну конструкцію pDAB4695, вирощували до рослини на стадії 6 листків і аналізували на експресію мРНК ендогенного гена β -кетואцил-АСР-синтетази II, ендогенного гена тубуліну і трансгена ZFP TF. Трансгенні рослини порівнювали з контрольними зразками, які трансформували бінарною конструкцією, що містить генну експресійну касету *pat* (*v2* промотору *AtUbi10:v3 pat:v3 3'-UTR ORF1 AtU*). З кожної рослини діркопробивачем для паперу стандартного розміру отримували зразки шести відбитків листя на льоду і по інструкціях виробника виділяли тотальну мРНК з використанням набору для виділення РНК в 96-ямковому форматі Qiagen 96-well RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, Carlsbad, CA). Аналізи експресії мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II, тубуліну і ZFP TF проводили з використанням протоколів, описаних вище в прикладі 4.

Експресія мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II у незалежних трансгенних рослин T_0 варіювала. У 16 аналізованих випадках спостерігали підвищення експресії мРНК більше ніж в 3 рази (фігура 3). Всі рослини були позитивними по експресії ZFP TF. Крім того, для розрахунку експресії мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II на початковому рівні використовували 27 контрольних рослин. Для розрахунку кратності росту експресії середню експресію мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II на основі контролів на початковому рівні порівнювали з експресією мРНК β -кетואцил-АСР-синтетази II окремих випадків рослин з ZFP TF (фігура 3). Ці рослини вирощували до дозрівання для отримання насіння T_1 . Перед цвітінням всі рослини індивідуально закривали мішками для самозапилення для полегшення самозапилення квіток на рослині. Насіння T_1 цих рослин збирали приблизно через 4 місяці після їх перенесення в теплицю.

Для подальшого дослідження вибирали випадки 3, 6 і 12.2 (що далі позначається як випадок 12), що представляють різні діапазони експресії.

Приклад 6: Аналіз зразків трансформованих рослин T_1

6.1 Аналіз жирних кислот насіння T_1

Для дослідження дії ZFP TF на зміну вмісту жирних кислот проводили аналіз жирних кислот одиничного насіння в 24 окремих насінинах T_1 на випадок (таблиця 5). Використовували спосіб аналізу метилового ефіру жирних кислот (FAME) на основі способу AOCS Ce2-66(97), і всі значення в таблиці 5 приведені як процент від всіх жирних кислот, присутніх в насінні каноли.

Таблиця 5

Профіль жирних кислот окремих насінин T_1 , який вимірюється аналізом FAME

Випадки	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Всі C18
3 Низький	2,8	0,3	1,6	76,1	12,2	3,7	93,6
3 Низький	2,9	0,3	1,4	76,7	11,8	4,0	93,9
3 Низький	2,9	0,3	1,4	75,7	13,0	3,8	93,9
3 Високий	3,6	0,3	1,4	75,1	13,0	3,5	93,1
3 Високий	3,8	0,4	1,4	75,6	12,0	3,8	92,8
3 Високий	4,0	0,4	1,5	74,8	12,6	3,7	92,5
Середнє (n=24)	3,3	0,3	1,5	75,7	12,4	3,8	93,3
Ст. відх. (n=24)	0,5	0,1	0,1	0,7	0,5	0,1	0,34
12 Низький	3,1	0,2	1,5	76,4	12,0	3,8	93,6

Таблиця 5

Профіль жирних кислот окремих насінин T₁, який вимірюється аналізом FAME

Випадки	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Всі C18
12 Низький	3,2	0,3	1,4	77,0	11,5	3,4	93,3
12 Низький	3,2	0,2	1,8	80,9	7,5	3,2	93,5
12 Високий	3,6	0,3	1,5	76,8	11,7	3,1	93,2
12 Високий	3,6	0,3	1,6	76,0	11,9	3,5	93,0
12 Високий	3,6	0,3	1,8	77,3	10,8	3,0	92,9
Середнє (n=24)	3,4	0,3	1,6	77,4	10,9	3,3	93,2
Ст. відх. (n=24)	0,2	0,0	0,2	1,8	1,7	0,3	0,23
6 Низький	3,2	0,5	1,9	81,3	8,1	2,1	93,3
6 Низький	3,3	0,5	1,2	79,6	10,1	2,3	93,1
6 Низький	3,5	0,5	2,6	80,6	7,5	1,9	92,6
6 Високий	4,4	0,5	2,4	77,7	10,7	1,5	92,2
6 Високий	4,5	0,6	2,2	77,1	10,5	1,8	91,6
6 Високий	4,6	0,7	1,3	77,4	11,0	1,7	91,4
Середнє (n=24)	3,9	0,5	1,9	78,9	9,6	1,9	92,4
Ст. відх. (n=24)	0,6	0,1	0,6	1,8	1,5	0,3	0,54
Середнє по Nex710 (n=216)	3,8	0,4	2,3	78,1	9,5	2,5	92,5
Ст. відх. (n=216)	0,2	0,0	0,6	1,8	1,6	0,7	0,45

Для отримання зразків окреме одиничне насіння вміщували в марковані касетні пробірки на 96-ямковий планшет для виділення, що містить один сталний шар діаметром 3,175 мм (Small Parts, Miramar, FL). Пробірки закривали кришками, і насіння піддавали сухому помелу в GenoGrinder (SPEX CertiPrep Group, Metuchen, NJ) протягом 3,0 хвилин при 1300 ударах/хвилину. Кришки видаляли і в кожну ямку додавали 0,6 мл гептану. Ямки повторно закривали кришками і вміщували назад в GenoGrinder для додаткового дроблення протягом 2,0 хвилин при 1200 уд./хв. Потім зразки виймали і центрифугували при 3700 об./хв. протягом 10,0 хвилин при 6 °C. Використовуючи роботизований пристрій Beckman Coulter MC Robot, супернатант переносили в 96-ямковий планшет зі скляними вставками (MicroLiter, Suwanee, GA). У зразок додавали 40 мкл 1 % метоксиду натрію. 30 % маточний розчин метоксиду натрію розбавляли метанолом (Fluka/Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Чашки закривали покритою тефлоном панеллю і перед аналізом GC дозволяли інкубуватися при кімнатній температурі протягом 4 годин.

Зразки аналізували на вміст жирних кислот на Agilent 6890 GC-FID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), обладнаному колонкою J&W Scientific DB-23, колонкою 15 м×0,25 мм ID і 0,25 мкм товщини плівки, (J&W Scientific, Folsom, CA). Початкова температура термостата становила 200 °C і цю температуру підтримували протягом запуску. Вхідний канал встановлювали на коефіцієнт розподілу 1:100 і температуру 280 °C. Протягом перших двох хвилин швидкість змінного потоку гелію підтримували на рівні 0,8 мл/хв. Потім потік збільшували від швидкості 1,0 мл/хв. до 2,5 мл/хв. і втримували протягом 1,5 хвилин. Детектор встановлювали на 300 °C з постійною подачею газу-носія і швидкістю в колонці 30 мл/хв., потоком паливного водню 30 мл/хв. і потоком окисника 400 мл/хв. Використовуваний об'єм для всіх зразків вприскування становив 2 мкл.

Індивідуальні піки метилових ефірів жирних кислот ідентифікували, проводячи порівняння з часом утримування еталонних стандартів метилового ефіру (GLC#428, Nu-Chek-Prep, Inc., Elysian, MN) з використанням програмного забезпечення Waters Corp. Empower Software. Залежно від загальних інтегральних площ піків при хроматографії розраховували індивідуальні процентні площі для всіх аналізованих речовин в еталонному стандарті. Також для ідентифікації будь-яких забруднень при GC проводили аналіз чистого гептану.

Порівняння насіння T₁ з трьома найменшими рівнями C16:0 (які з найбільшою імовірністю були позитивними по ZFP TF рослинами) і з трьома найвищими рівнями C16:0 (які з найбільшою імовірністю були нуль-рослинами по ZFP TF) показало, що зміни вмісту C16:0 можуть відбуватися в результаті сегрегації трансгена ZFP TF (таблиця 5). Також у всіх випадках спостерігали відповідну зміну всіх C18 (C18:0+C18:1+C18:2+C18:3); насіння з низькими рівнями C16:0 містило збільшені рівні всіх C18 і навпаки. Це відбувалося, незважаючи на варіабельність індивідуального вмісту жирних кислот C18:0, C18:1, C18:2 і C18:3 в результаті сегрегації мутантних генів fad2 і fad3 (Hu, X., et al. Theor. Appl. Genet. 2006, 113:497-507) в генотипі

Nex710, який піддавали трансформації. Таким чином, робили наступну стадію для ідентифікації позитивних по ZFP TF і сестринських нуль-рослин в сегрегуючій популяції T₁ в кожному випадку для детекції фактичної зміни профілю жирних кислот при схожому генетичному фоні.

6.2 Аналіз присутності ZFP TF в рослинах T₁

- 5 100-150 сходів T₁ всіх трьох випадків перенесення трансгена 3, 6 і 12 піддавали скринінгу для ідентифікації позитивних по ZFP TF і сестринських нуль-рослин (таблиця 6). Рослини тестували на присутність щонайменше однієї повнорозмірної касети трансгена ZFP TF. З листя цих рослин відповідно до рекомендацій виробників виділяли тотальну геномну ДНК з використанням набору для виділення QIAGEN PLANT DNEASY extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Протокол модифікували додаванням до буфера Qiagen API PVP-40 в кінцевій концентрації 10
- 10 Очищену гДНК кількісно визначали по протоколу кількісного визначення ДНК PICOGREEN® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Зразки ДНК досліджували на присутність щонайменше однієї повнорозмірної копії трансгена ZFP TF за допомогою аналізу ПЛР, що містить наступні реагенти: 5 мкл 10X буфера EX Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Siga, Japan), 5 мкл 15
- 10 % полівінілпіролідону-40, 1,0 мкл 10 мкМ маточного розчину прямого праймера ubi10 (SEQ ID NO:35: 5'-GGTCAACGGATCAGGATATTCTTG-3'), 1,0 мкл зворотного праймера AtuORF23 (SEQ ID NO:36: 5'- CCATGTTGGCAAAGGCAACC-3'), 10 мкМ маточний розчин, 4 мкл dNTP (2,5 мМ кожні), 0,2 мкл TaKaRa EX Taq™ Hot Start, 31,8 мкл води і 2 мкл ДНК з концентрацією 10 нг/мкл. Умови проведення циклів ПЛР були наступними: 94 °C протягом 2 хв., 10 циклів ступінчастої
- 20 ПЛР з 98 °C протягом 10 сек..., 65 °C протягом 20 сек., з температурою, що знижується на 0,5 °C в кожному циклі до 60 °C з подальшими 72 °C протягом 3:00 хв. За цим слідувало 35 циклів з 98 °C протягом 10 сек..., 60 °C протягом 20 сек., і 72 °C протягом 3:00 хв. і кінцевою елонгацією при 72 °C протягом 10 хв. 5 мкл суміші після кожної реакції запускали на 1 % агарозному гелі для детекції присутності смуги ZFP TF очікуваного розміру 2662 п.н.
- 25 Розроблений аналіз кількісної ПЛР з детекцією в реальному часі для гена pat, який молекулярно зчеплений з ZFP TF в конструкції rDAB4695, і його застосовували для ідентифікації позитивних по pat і нуль-рослин для підтвердження його генетичної сегрегації з касетою ZFP TF, з який він молекулярно зчеплений.

Таблиця 6

Ідентифікація позитивних по ZFP TF і сестринських нуль-рослин в сегрегуючій популяції T₁ в трьох випадках

Випадки	Все посаджене насіння T ₁	Ідентифіковані рослини з ZFP TF/нуль-рослини T ₁	Рослини T ₁ з ZFP TF/нуль-рослини, які вирощуються до отримання насіння T ₂
3	150	115/7	12/7
6	100	66/27	5/5
12	150	126/6	8/6

30

- Реакційна суміш для аналізу ПЛР-ПЧ TaqMan pat містила наступне: 3 мкл основної суміші Roche LIGHTCYCLER® Cyclo 480 II Probes 2X, 0,6 мкл 10 % PVP-40, 0,2 мкл 10 мкМ маточного розчину прямого праймера pat (SEQ ID NO:37:5'-ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT-3'), 0,2 мкл 10 мкМ маточного розчину зворотного праймера PAT (SEQ ID NO:38:5'-
- 35 CTTTGATGCSTATGTGACACGTAACAGT-3'), 0,2 мкл 5 мкМ маточного розчину зонда (SEQ ID NO:39:5'-6FAM-CCAGCGTAAGCAATACCAGCCACAACACC-гасник-3'), і її змішували з наступними реагентами для внутрішнього еталонного стандарту HMG (GenBank: AF127919), як вказано нижче: 0,2 мкл 10 мкМ маточного розчину прямого праймера HMG (SEQ ID NO:40:5'-
- 40 CCTCTCTACCACCGTCTCAGTATG-3'), 0,2 мкл 10 мкМ маточного розчину зворотного праймера HMG (SEQ ID NO:41:5'-GATCTGGCCGGAGTGTTC-3'), 0,2 мкл 5 мкМ маточного розчину зонда (SEQ ID NO:42:5'-6FAM-CGCTCCTCAGCTACCACCTCAACCA-гасник-3'), 1 мкл ДНК і 0,2 мкл води. Умови проведення циклів ПЛР являли собою: 1 цикл із 95 °C протягом 5 хв., 40 циклів з 95 °C протягом 10 сек., 60 °C протягом 40 сек. і 72 °C протягом 1 сек. Усі зразки ампліфікували в трьох екземплярах у 384-ямкових планшетах разом з 1-4 копіями стандартів трансгенної
- 45 геномної ДНК у пристрої для ПЛР Roche LIGHTCYCLER® 480.

На основі пропорцій сегрегації позитивних по ZFP TF і нуль-рослин у кожному випадку, у випадках 3, 6 і 12 відбувалося приблизно 2, 1 і 2 вставок трансгена ZFP TF у геномі B. parvus, відповідно (таблиця 6, колонка 3). Ці дані збігаються з даними по сегрегації гена pat у всіх трьох випадках.

6.3 Підвищення експресії мРНК β -кетоацил-АСР-синтетази II у рослинах T₁

Потім усі позитивні по ZFP TF і сестринські нуль-рослини T₁, представлені в таблиці 6, колонка 3, піддавали аналізу експресії мРНК гена ендогенної β -кетоацил-АСР-синтетази II, трансгена ZFP TF і ендогенного гена тубуліну. Останній служив як еталонний ген для нормалізації експресії генів β -кетоацил-АСР-синтетази II і ZFP TF. Одержували зразки шести відбитків листя з кожної рослини на стадії 6 листків на льоду і виділяли тотальну РНК із використанням набору QIAGEN RNeasy®. Синтез і розведення ланцюгів кДНК проводили, як описано в приклад 4.1.

Для всіх трьох генів проводили аналіз кПЛР-РЧ синтезованих кДНК. Аналіз експресії мРНК β -кетоацил-АСР-синтетази II і тубуліну проводили, як описано в прикладі 4,2 і прикладі 4,3, відповідно. Аналіз ZFP TF модифікували. Реакцію ПЛР складали в такий спосіб: умови реакції були наступними: 7,5 мкл 2X основного буфера LC480 Probes Master Buffer (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 0,3 мкл геноспецифічного прямого праймера № 1 (SEQ ID NO:43:5'-TCGATCTTGATATGTTGGGAGA-3') (10 мкм маточний розчин), 0,3 мкл геноспецифічного зворотного праймера № 2 (SEQ ID NO:44:5'-AGGTGCAGAATCATGTGGTG-3') (10 мкм маточний розчин), 0,15 мкл зонда UPL № 85, 1,5 мкл 10 % (мас/об.) PVP-40 і 3,9 мкл води. Розмічали 384-ямковий мікропланшет і додавали 13,5 мкл описаної вище суміші на ямку. До планшета прикріплювали герметизуючу фольгу, і планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. Плівку видаляли і додавали 1,5 мкл розморожених розведених перших ланцюгів на ямку. Крім того, в окремі контрольні ямки додавали стандарти кДНК. Планшет герметизували герметизуючою кришкою з фольгою і повторювали етап центрифугування. Програму ПЛР проводили в наступних умовах: i. Активація при 95 °C протягом 5 хвилин, ii. Денатурація при 95 °C протягом 10 сек. (@ 4,8 °C/сек.), iii. Відпал/елонгація при 60 °C протягом 25 сек. (@ 2,5 °C/сек.), iv. Добудування при 72 °C протягом 1 сек. (@ 4,8 °C/сек.), v. Повторення етапів ii-iv ще 39-49 разів, vi. Охолодження до 38 °C протягом 5 сек.

Експресія мРНК ZFP TF була найменшою у випадку 6 і найвищою у випадку 3 з позитивних по ZFP TF зразків (фігура 4). Нуль-рослини неекспресували мРНК ZFP TF, що означало, що аналіз ZFP TF був специфічним для присутності трансгена ZFP TF. Рівні мРНК гена β -кетоацил-АСР-синтетази II, мішені для ZFP TF, були підвищені в позитивних по ZFP TF рослинах у всіх випадках (фігура 5). При попарному порівнянні позитивних по ZFP TF і відповідних сестринських нуль-рослин у кожному випадку спостерігали до 3-4-кратного зростання експресії мРНК β -кетоацил-АСР-синтетази II. Рівні підвищення експресії мРНК β -кетоацил-АСР-синтетази II були зв'язаними з рівнями підвищення експресії мРНК ZFP TF у кожному випадку (фігура 4), наприклад, найменшими у випадку 6 і найбільшими у випадку 3.

6.4 Аналіз жирних кислот у листі рослин T₁

Спільно зі збором зразків для аналізу мРНК, описаного в прикладі 6.3, проводили збір другого набору зразків листя T₁ для аналізу жирних кислот. Однак на жирні кислоти аналізували тільки підмножину зразків тих рослин, що вирощували, як показано в таблиці 6, колонка 4. Проводили аналіз метилових ефірів жирних кислот (FAME), як вказано нижче. Матеріал листя масою 10-100 мг збирали на льоду, а потім перед реакцією трансметилування ліофілізували 0,25M метоксидом натрію в безводному метанолі при 40 °C протягом 20 хвилин. Після реакції трансметилування жирні кислоти три рази екстрагували розчином гептану, що містить як сурогатний стандарт гептадеканоїн. Виділені гексанові фракції висушували і ресуспендували у відомому об'ємі гептану. Отримані метилові ефіри жирних кислот (FAME) аналізували за допомогою GC-FID з використанням капілярної колонки BPX 70 з SGE (15 м×0,25 мм×0,25 мкм). Кожен FAME ідентифікували по його часу утримання і кількісно визначали за допомогою упорскування як калібрований стандарт еталонної суміші олії насіння ріпаку з Matreya LLC. Завершеність реакції підтверджували, перевіряючи присутність ендогенних FAME при четвертій екстракції/одержанні похідних.

Усі три випадки при парних порівняннях позитивних по ZFP TF і відповідних сестринських нуль-рослин у кожному випадку продемонстрували зниження загального вмісту C16:0 і одночасне збільшення вмісту всіх C18 (таблиця 7). Наприклад, позитивні по ZFP TF рослини у випадку 12 у порівнянні з їх власними сестринськими нуль-рослинами демонстрували зниження вмісту C16:0 на 6,3 % і збільшення вмісту всіх C18 на 1,44 %.

Таблиця 7

Профіль жирних кислот в листі T₁

Назва зразка	Аналізовані рослини	C16:0		Всі C18	
		Середнє	Ст. відх.	Середнє	Ст. відх.
12нуль	6	10,98	0,31	69,93	0,91
12ZFP	8	10,29	0,39	70,94	1,02
3нуль	7	10,79	0,56	69,84	1,18
3ZFP	12	10,34	0,29	71,25	0,74
6нуль	5	11,94	0,47	70,36	1,91
6ZFP	5	10,44	0,62	72,16	2,88

Приклад 7: Аналіз трансгенного насіння T₂ з ZFP TF

Підмножина позитивних по ZFP TF рослин, що демонструє найвищу експресію мРНК β-кетотацил-АСР-синтетази II і сестринських нуль-рослин в кожному випадку, вирощували до дозрівання з отриманням насіння T₂ (таблиця 6, колонка 4). Винятком був випадок 3, де також вирощували невелику кількість позитивних по ZFP TF рослин з меншими діапазонами експресії. Вони можуть являти собою іншу сегрегуючу вставку трансгена pDAB4695. Кожну рослину T₁ закривали сітчастим мішком для полегшення самозапилення в даній рослині. Збирали насіння і аналізували рівні жирних кислот.

Аналіз жирних кислот T₂ проводили на сукупності з 24 насінин на рослині, як описано для аналізу насіння T₁ в прикладі 6.1. Результати продемонстрували зниження вмісту C 16:0 в позитивних по ZFP TF рослинах у всіх трьох випадках при попарному порівнянні з їх відповідними сестринськими нуль-рослинами (таблиці 8A і 8B). Це зниження вмісту C 16:0 становило 12,6 %, 11,2 % і 22,3 % для випадків 12, 3 і 6, відповідно. Також спостерігали узгоджене зниження вмісту C16:1. Відповідно до зниження вмісту C16:0 і C16:1 в позитивних по ZFP TF рослинах при попарному порівнянні з відповідними сестринськими нуль-рослинами спостерігали одночасне збільшення вмісту всіх CI 8 (C18:0+C18:1+C18:2+C18:3). Всі три попарних порівняння позитивних по ZFP TF і відповідних сестринських нуль-рослин при аналізі з використанням статистичного програмного забезпечення JMP були статистично значимими (p<0,001) відносно зростання вмісту всіх C16 (C16:0+C16:1) і вмісту всіх C16/всіх C18 (фігура 6, A і B). Хоч на основі спостережень сестринських нуль-рослин ці три випадки варіювали за вмістом в них C16:0 (таблиці 8A і 8B), ZFP TF був ефективним в зниженні вмісту C16:0 до приблизно схожих рівнів приблизно від 2,93 до 3,05. Хоч всі позитивні по ZFP TF рослини у випадках 3 і 12 дають насіння (таблиці 8 і 9), з рослин у випадку 6 насіння дає тільки одна рослина, яка містить ZFP TF. Ця конкретна рослина у випадку 6 на основі даних про вміст жирних кислот в листі T₁ мала найбільший вміст C 16:0. У таблицях 8A і 8B представлене порівняння профілів жирних кислот T₂ у трьох випадках перенесення трансгена B. napus з позитивних по ZFP TF pDAB4695 і відповідних сестринських нуль-рослин. Ці дані отримували із застосуванням аналізу FAME, і вони описані в розділі 6.1. Проводили аналіз жирних кислот C12:0-C24:1 і більшість з них представлена в цих таблицях. Всі значення представлені як процент від всіх жирних кислот, присутніх в насінні B. napus.

Таблиця 8А

Аналіз жирних кислот (46:0, (16:1, C18:0, C:18:1, C:18:2 і C:18:3

Зразки	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Середнє для 12Нуль	3,49	0,26	1,29	76,59	11,45	3,73
Ст. відх. (n=6)	0,06	0,01	0,05	0,25	0,21	0,04
12ZFP Середнє	3,05	0,20	1,33	76,53	11,63	3,87
ст. відх. (n=8)	0,11	0,02	0,04	0,39	0,33	0,06
Середнє для 3Нуль	3,30	0,25	1,31	74,34	13,18	3,94
Ст. відх. (n=7)	0,17	0,02	0,10	1,04	0,86	0,25
Середнє для 3ZFP	2,93	0,18	1,30	74,10	13,62	4,14
Ст. відх. (n=12)	0,12	0,01	0,08	1,80	1,45	0,25
Середнє для 6Нуль	3,77	0,38	2,02	73,46	12,42	3,66
Ст. відх. (n=4)	0,15	0,08	0,14	2,80	2,44	0,66
6ZFP (n=1)	2,93	0,17	1,07	77,89	10,65	3,24

Таблиця 8В

Аналіз жирних кислот C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1, C24:0 і C24:1

Зразки	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
Середнє для 12Нуль	0,53	1,26	0,05	0,33	0,02	0,14	0,14
Ст. відх. (n=6)	0,03	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02	0,02
Середнє для 12ZFP	0,55	1,37	0,06	0,36	0,02	0,15	0,16
Ст. відх. (n=8)	0,02	0,05	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
Середнє для 3Нуль	0,59	1,49	0,06	0,43	0,02	0,15	0,21
Ст. відх. (n=7)	0,07	0,11	0,01	0,07	0,01	0,03	0,04
Середнє для 3ZFP	0,57	1,57	0,07	0,42	0,03	0,15	0,19
Ст. відх. (n=12)	0,04	0,21	0,02	0,07	0,01	0,04	0,04
Середнє для 6Нуль	0,80	1,49	0,07	0,54	0,03	0,30	0,24
Ст. відх. (n=4)	0,08	0,13	0,01	0,08	0,01	0,07	0,02
6ZFP (n=1)	0,52	1,86	0,07	0,42	0,04	0,20	0,22

В таблиці 9 представлені загальні профілі жирних кислот на основі окремих жирних кислот, представлених в Таблицях 8А і 8В.

Таблиця 9

Зразки	Всі C18*	Всі LC**	Всі насич.***
Середнє для 12Нуль	93,06	95,52	5,83
Ст. відх. (n=6)	0,13	0,05	0,09
Середнє для 12ZFP	93,36	96,01	5,48
Ст. відх. (n=8)	0,11	0,13	0,09
Середнє для 3Нуль	92,78	95,74	5,82
Ст. відх. (n=7)	0,39	0,17	0,32
Середнє для 3ZFP	93,16	96,14	5,41
Ст. відх. (n=12)	0,41	0,13	0,19
Середнє для 6Нуль	91,55	95,01	7,47
Ст. відх. (n=4)	0,36	0,29	0,40
6ZFP(n=1)	92,85	96,18	5,17

*Всі C18 являють собою суму наступних ланцюгів атомів вуглецю: C18:0, C18:1, C18:2 і C18:3.

**Всі LC або довголанцюжкові являють собою суму наступних ланцюгів атомів вуглецю: всі C18+всі C20 (C20:0+C20:1+C20:2)+всі C22(C22:0+C22:1)+всі C24(C24:0+C24:1)

***Всі насич. являють собою всі насичені жирні кислоти, представлені в Таблицях 8А і 8В.

Комбінуючи всі довголанцюжкові жирні кислоти (всі C18, всі C20, всі C22 і всі C24), в позитивних по ZFP TF рослинах в різних випадках в порівнянні з сестринськими нуль-рослинами спостерігали зростання від 0,4 % до 1,2 %. Серед жирних кислот з більш довгим ланцюгом помітним було збільшення C20:1 на 25 % в позитивних по ZFP TF рослинах у випадку 6. У всіх випадках в рослинах, які містять ZFP TF, також спостерігали зниження вмісту всіх насичених жирних кислот. Воно знаходилося в діапазоні від 6 % зниження у випадку 12 до 31 % зниження у випадку 6.

Таким чином, проілюстрована опосередковувана ZFP TF активація транскрипції гена β -кетואцил-ACP-синтетази II в рослинах T₀ і T₁ і одночасному зниженні вмісту всіх жирних кислот C16 і збільшенні вмісту всіх жирних кислот C18 в насінні T₂. Ці дані демонструють успішне застосування нових технологій ZFP TF для спрямування на конкретні гени в шляху біосинтезу жирних кислот і їх модифікації, що приводять до прогнозованих змін профілів олії насіння, які успадковуються в поколіннях потомства.

Приклади 8-15: Підвищення/зниження експресії FatB

Пластиди є головною ділянкою біосинтезу жирних кислот *de novo* у вищих рослинах (Ohlrogge et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1194-8; Thelen and Ohlrogge, 2002, Metabolic Engineering 4:12-21). Жирні кислоти, що не використовуються в плазмідах, експортуються в цитоплазму за допомогою специфічної активності ацил-ACP-тіоестераз (FAT) при гідролізі ацил-ацилпереносних білків (ацил-ACP) з вивільненням вільних жирних кислот. У рослин існують два класи ферментів FAT, FATA і FATB. Для класу FATA *in vitro* переважні 18:1-ACP, тоді як для класу FATB переважні субстрат насичених ацил-ACP, такі як 16:0-ACP і 18:0-ACP, але також він демонструє іншу гетерогенну субстратну специфічність (Doermann et al., 1995, Arch. Biochem. Biophys. 316:612-618; Voelker et al., 1997, Plant Physiology 114:669-677; Salas and Ohlrogge, 2002, Archives of Biochemistry and Biophysics, 403:25-34). Вважають, що FATB, подібно до FATA, також присутній у всіх тканинах рослини, але переважно він експресується в насінні, що розвивається (Jha et al., 2006, Plant Physiology and Biochemistry 44:645-655).

Ядерний геном *Arabidopsis* кодує два гени FatA і один ген FatB. Пригнічення активності FatB може істотно знизити вміст насичених жирних кислот в гліцероліпідах. Наприклад, в мутанті FatB, отриманому за допомогою вставляння Т-ДНК, вміст пальмітату (16:0) і стеарату (18:0) знижувалося на 42-56 % і 30-50 %, відповідно, залежно від тканини (Bonaventure et al., The Plant Cell, 2003 15:1020-1033). Швидкість росту рослин у цього мутанта значною мірою пригнічувалася, приводячи до 50 % зниження сирової маси на 4 тижні в порівнянні з диким типом. Це відкриття підтримує точку зору, що служить FatB як основний фактор, який керує зміною насичених жирних кислот у рослин.

Основна культура олійного насіння *Brassica napus* являє собою амфідиплоїдний вид, близькоспоріднений з модельним видом *Ambidopsis*, але з розміром генома приблизно у вісім разів більшим, ніж геном *Arabidopsis*. У результаті у цього виду описано шість генів FatB (WO 2009/007091) в порівнянні з одним у *Arabidopsis*. Ця складність утруднює розуміння функції окремих генів FatB при маніпуляціях з ними. І навпаки, присутність більшої кількості генів спрощує маніпуляції з експресією декількох генів відносно необхідних показників бажаних жирних кислот замість їх повного нокауту. Відомо, що фактори транскрипції з цинковими пальцями по суті зв'язуються з будь-якою послідовністю ДНК і модулюють генну функцію генів-мішеней (Van Eenennaam et al., Metab. Eng. 2004 6:101-108; Sanchez et al., 2006, Plant Biotechnology Journal 4:103-114). Як результат, цей інструмент можна застосовувати до генів FatB для розуміння їх функції в *B. napus*. Це знання може допомогти в маніпуляціях з експресією від одного до декількох генів FatB відносно бажаної "корисної для здоров'я" олії насіння каноли з меншим вмістом насичених жирних кислот.

Приведені нижче приклади 8-15 демонструють активацію транскрипції генів FatB у *Brassica napus* L., що приводить до змін профілів жирних кислот в насінні.

Приклад 8: Ідентифікація послідовностей-мішеней для генів FatB у *Brassica napus* L.

8.1 Ідентифікація послідовностей-мішеней

Для пошуку і характеристики промоторних послідовностей генів FatB сорти Nex710 *Brassica napus* використовували модифікований протокол "прогулянки по геному". Ці нуклеотидні послідовності виділяли і ідентифікували для складання і отримання ZFP TF, які можна використовувати для модифікації експресії гена FatB. Конструювали дев'ять бібліотек для "прогулянки по геному" з використанням набору Clontech Genome Walking Kit (Palo Alto, CA). Ці бібліотеки застосовували для отримання послідовності довжиною ≈ 1 т. п. н. вище ділянки старту транскрипції генів FatB. На основі послідовностей EST FatB, доступних в загальнодоступних базах даних, складали і синтезували пару прямих вкладених праймерів, специфічних до гена FatB. Пару зворотних вкладених праймерів складали і синтезували для

гібридизації з адаптерними послідовностями. З цих дев'яти бібліотек ампліфікували декілька фрагментів ПЛР. Отримані фрагменти ПЛР клонували у вектори TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) і секвенували для ідентифікації промоторних послідовностей FatB. На основі цього підходу ідентифікували два гени FatB, FatB4 і FatB5. Виявили, що хоч кодуєчі послідовності цих генів FatB були високонсервативними, послідовності в 5'-UTR і промоторних областях відрізнялись.

Експресія FatB і кількісне визначення генів FatB4 і FatB5 за допомогою аналізу кількісної ПЛР-РЧ в насінні *B. parvus*, що розвивається, дозволяють передбачити, що ці гени високоекспресовані в насінні *B. parvus*. Тотальну РНК виділяли, кількісно визначали і ділянки ініціації транскрипції картували, як описано вище в прикладі 1. Промоторні послідовності цих двох генів використовували для складання ZFP TF для модифікації експресії на рівні транскрипції.

Приклад 9: Конструювання ДНК-зв'язувальних доменів ZFP, специфічних до генів FatB

Конструювали білки з цинковими пальцями до різних ділянок-мішеней в гені FatB. Нижче в таблицях 10A і 10B представлені ділянки-мішені і розпізнавальні спіралі для характерних складів ZFP.

Таблиця 10A

Ділянки зв'язування-мішені FatB для ZFP TF

ZFP	Ділянка-мішень FatB4 (від 5' до 3') aaCGAAAGgAGATCG	Ділянка-мішень FatB5 (від 5' до 3') cgAAAGGGAGATCGAG	Специфічність до FatB
13685*	AGAGAGgagagag (SEQ ID NO:47) Відсутність ділянки	Відсутність ділянки зв'язування AGAG gcaccgca (SEQ ID NO:48)	FatB4
13714	зв'язування aaGGAGAAcTTTAGGG	aaGGAGAArTTTAGGGT	FatB5 FatB4 і
13722	TTTGGggagact (SEQ ID NO:49)	TTGGgggagact (SEQ ID NO:50)	FatB5
13743**	ctCCGAAGAGATTGG CGTAAcacttcgt (SEQ ID NO:51)	ctCCGAAGAGATTGGCG TAA ccttcatt (SEQ ID NO:52)	FatB4 і FatB5

Таблиця 10B

Області розпізнавальних спіралей ZFP

ZFP	1*** RSDNLS	2 QSAHRK	3 RSDDLK	4 QSSHRK	5 RSDHLS	6 QNAHRI
13685	A(SEQ ID NO:75)	T(SEQ ID NO:76)	(SEQ ID NO:21)	T(SEQ ID NO:77)	V(SEQ ID NO:78)	E(SEQ ID NO:79)
13714	RSDNLS A(SEQ ID NO:75)	QSAHRK T(SEQ ID NO:76)	RSDDLK (SEQ ID NO:21)	QSSHRK T(SEQ ID NO:77)	RSDHLS K(SEQ ID NO:80)	QNAHRI T(SEQ ID NO:81)
13722	RSDHLS T(SEQ ID NO:82)	HSNTRK N(SEQ ID NO:83)	RSDHLSQ (SEQ ID NO:84)	NSASRK N(SEQ ID NO:85)	QSGNLA R(SEQ ID NO:16)	QSGHLS R(SEQ ID NO:86)
13743	NSDSL E(SEQ ID NO:87)	RRADLS R(SEQ ID NO:88)	RSDSL (SEQ ID NO:89)	QNAHRK T(SEQ ID NO:90)	RSDHLS Q(SEQ ID NO:84)	RNADRIT (SEQ ID NO:91)

*Великі букви являють собою зв'язувальну послідовність ZFP, тоді як маленькі букви, які розташовуються по боках, являють собою оточення з фланкуючих послідовностей для ділянки зв'язування ZFP TF. Маленькі курсивні букви між великими буквами являють собою пропущені основи при зіставленні ZFP.

** Зв'язувальна послідовність ZFP для FatBA і FatB5 є однаковою, але 3'-фланкуючі послідовності для двох генів відрізняються.

*** числа являють цинковий палець (1 представляє палець 1, 2 представляє палець 2 і т. д.)

Приклад 10: Опосередковане ZFP TF підвищення експресії природних генів FatB у *B. napus*. Для ілюстрації опосередкованого ZFP TF підвищення експресії FatB в клітинах *B. napus*, отримували конструкції, що містять чотири склади генів ZFP TF (таблиці 10 і 11), ці гени доставляли в клітини *B. napus* для стабільної експресії за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації.

10.1 Складання конструкцій

Складені і сконструйовані бінарні плазмиди з ZFP TF перераховані в таблиці 11 нижче. Експресію генів ZFP TF вміщували під контроль відносно сильного конститутивного промотору, такого як промотор, що походить з промотору вірусу мозаїки жилок маніоки (CsVMV). Опосередковувану *Agrobacterium* трансформацію рослин проводили, як описано в прикладі 3.2, зі стабільним вбудовуванням ZFP TF в геном *B. napus*.

Таблиця 11

Описані конструкції ZFP TF, направлених на гени FatB *B. napus*

S.N.	ZFP	№ конструкції	Генна касета
1	13685	pDAB4689	MAR RB7/CsVMV/NLS Op-2-ZFP 13685 VP16/3'-UTR AtuORF23/AtUbi 10/Pat/3'-UTR AtuORF1
2	13714	pDAB4690	MAR RB7/CsVMV/NLS Op-2-ZFP 13714- VP16/3'-UTR AtuORF23/AtUbi 10/Pat/3'-UTR AtuORF1
3	13722	pDAB4691	MAR RB7/CsVMV/NLS Op-2-ZFP 13722- VP16/3'-UTR AtuORF23/AtUbi 10/Pat/3'-UTR AtuORF1
4	13743	pDAB4692	MAR RB7/CsVMV/NLS Op-2-ZFP 13743- VP16/3'-UTRAtuORF23/AtUbi10/Pat/3'-UTR AtuORF1

pDAB4689 являє собою бінарну плазмиду, яка містить генні експресійні касети послідовності ядерної локалізації або NLS opaque-2 (Op-2)/13685/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7 (область прикріплення до матриксу (Thompson та інші., 1997, WO9727207)):v2 промотору CsVMV (промотор вірусу мозаїки жилок маніоки (Verdaguer et al., 1996, Plant Molecular Biology 31:1129-1139)):NLS opaque-2 (Van Eenennaam et al., 2004, Metabolic Engineering 6:101-108; Holmes-Davis et al., 2005, Plant Molecular Biology 57:411-423)/злиття цинкового пальця 13685/VP16 (Jamieson та інші., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 348:873-879):v1 3'-UTR AtuORF23 (3'-нетрансльована область відкритої рамки зчитування 23 *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin та інші., 1987, EP222493)):v2 промотору AtUbi10 (промотор убіквітину 10 *Arabidopsis thaliana* (Callis, та інші., 1990, J. Biol. Chem. 265:12486-12493)):v5 pat (фосфінотрицинацетилтрансфераза (Wohlleben et al., 1988, Gene 70:25-37)):v4 3'-UTR AtuORF1 (3'-нетрансльована область відкритої рамки зчитування 1 *Agrobacterium tumefaciens* (Huang та інші., J. Bacteriol. 172:1814-1822)). Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, який містить злиття NLS opaque-2/цинковий палець 13685/VP16, в pDAB3912 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку помічали як pDAB8215, містила генну експресійну касету v2 промотору CsVMV:злиття NLS opaque-2/цинковий палець 13685/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23. pDAB8215 клонували в бінарну плазмиду pDAB4668 шляхом реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). В даній реакції отримували pDAB4689 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAB4690 являє собою бінарну плазмиду, яка містить генні експресійні касети NLS opaque-2/13114/WP16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:v2 промотору CsVMV:злиття NLS opaque-2/цинковий палець 13714/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали шляхом клонування фрагмента ДНК, який містить злиття NLS opaque-2/цинковий палець 13714/VP16, в pDAB3912 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку помічали як pDAB8216, містила генну експресійну касету v2 промотору CsVMV:злиття NLS opaque-2/цинковий палець 13714/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23. pDAB8216 клонували в бінарну плазмиду pDAB4668 шляхом реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). В даній реакції отримували pDAB4690 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAB4691 являє собою бінарну плазмиду, яка містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13122/VP 16 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:v2 промотору CsVMV:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5 pat (фосфінотрицинацетилтрансфераза):v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали шляхом клонування фрагмента ДНК, який містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/VP16, в pDAB3912 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку помічали як pDAB8217, містила генну експресійну касету v2 промотору CsVMV:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23. pDAB8217 клонували в бінарну плазмиду pDAB4668 шляхом реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). В даній реакції отримували pDAB4691 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAB4692 являє собою бінарну плазмиду, яка містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13743/VP 16 и pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7 (область прикріплення до матриксу:v2 промотору CsVMV:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13743/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10 (промотор убіквітину 10 Arabidopsis thaliana):v5 pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали шляхом клонування фрагмента ДНК, який містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13743/VP16, в pDAB3912 по ділянках рестрикції NcoI-SacI. Отримана конструкція, яку помічали як pDAB8218, містила генну експресійну касету v2 промотору CsVMV:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13743/VP16:v1 3'-UTR AtuORF23. pDAB8218 клонували в бінарну плазмиду pDAB4668 шляхом реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). В даній реакції отримували pDAB4692 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

Приклад 11: Аналіз трансформованих зразків калюсів

Лінії трансгенних калюсів *B. napus* отримували за допомогою трансформації чотирьох конструкцій ZFP TF, pDAB4689-pDAB4692, і контрольної конструкції, pDAB8210, за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації рослин, як описано в прикладі 3,2. Контрольна конструкція, pDAB8210, яка містила генну експресійну касету pat (Промотор AtUbi10/pat/3'-UTR AtuORF1) і касету ненаправленої ZFN (промотор CsVMV/ZFN/3'-UTR AtuORF23). Зі всіх ліній виділяли тотальну РНК і синтезували кДНК, як описано в прикладі 4.1. Єдиною модифікацією описаного раніше протоколу було використання як праймерів для реакцій отримання кДНК праймерів оліго-dT замість випадкових гексамерів і відповідна зміна реакції кДНК, по інструкціях виробника.

11.1 Аналіз експресії мРНК FatBA і FatBb

11.1.1 Аналіз FatBA за допомогою кількісної ПЛР з детекцією в реальному часі (кПЛР-РЧ) у *B. napus*

Суміш ПЛР для ампліфікації кДНК FatB4 складали наступним чином: 1,5 мкл 10X буфера для ПЛР з гарячим стартом (Qiagen, Valencia, USA), 1,2 мкл 10 мМ dNTP, 1 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,15 мкл Qiagen Hot Start Taq (5 Од/мкл), 0,5 мкл 10 мМ маточного розчину прямого праймера zzi43 (SEQ ID NO:53: CTTTGAACGCTTATCTTCCTC) (10 мМ маточний розчин), 0,5 мкл 10 мМ маточного розчину зворотного праймера FATB5_R4 (SEQ ID NO:54: TTCCACAACATCTCCCCAAG), 0,25 мкл 5 мМ маточного розчину зонда TaqMan MGB (Life Technologies, Carlsbad, California) FatB4_MGB_Probe_4 (SEQ ID NO:55: FAM-CTCAGGCTCCACCC), 1,5 мкл 10 % (мас./об.) PVP-40 і H₂O до 13,5 мкл на одну реакцію. Розмічали прийнятний квадрант(и) 384-ямкового мікропланшета і заповнювали в об'ємі 13,5 мкл основної суміші на ямку. До планшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугу для мікропланшетів Qiagen. Потім у відповідні ямки додавали 1,5 мкл розморожених розведених перших ланцюгів кДНК з наступним додаванням 1,5 мкл стандартів плазмідної кДНК з концентрацією ДНК в контрольних ямках від найменшої до найбільшої. На завершення герметизуючу фольгу міцно прикріплювали до планшета і центрифугували. Програму ПЛР проводили в системі для ПЛР з детекцією в реальному часі LIGHTCYCLER® 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) з використанням наступної програми: 1) активація при 95 °C протягом 15 хвилин; 2) денатурація при 95 °C протягом 20-30 сек. (@ 4,8 °C/сек.); 3) відпал при 60 °C протягом 20-30 сек. (@ 2,5 °C/сек.); 4) добудова при 72 °C протягом 45-60 сек. (@ 4,8 °C/сек.); повторення етапів 2)-4) ще 39-49 разів; 5) охолодження до 38 °C протягом 5 сек. для зупинки реакції.

Розмір амплікона FatBA складав 678 п. н. Ця послідовність перекриває інтрон довжиною 79 п.н. на основі геномної послідовності. Крім того, зворотний праймер сконструйований з перекриванням інтрона, таким чином, сприяючи специфічній ампліфікації тільки кДНК FatBA, таким чином, усуваючи ампліфікацію геномної ДНК.

11.1.2 Аналіз кПЛР-РЧ FatB5 у *B. napus*

Суміш ПЛР для ампліфікації кДНК FatB5 складали наступним чином: 1,5 мкл 10X буфера для ПЛР з гарячим стартом (Qiagen, Valencia, USA), 1,2 мкл 10 мМ dNTP, 1 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,15 мкл Qiagen Hot Start Taq (5 Од/мкл), 0,5 мкл 10 мкМ маточного розчину прямого праймера zz145 (SEQ ID NO:56: CTTTGAAGCTCATCTTCCTC), 0,5 мкл 10 мкМ маточного розчину зворотного праймера FATB5_R4 (SEQ ID NO:57: TTCCACAACATCTCCCAAG), 0,25 мкл 5 мкМ маточного розчину зонда TaqMan MGB (Life technologies, Carlsbad, California) FatB5_MGB_Probe_1 (SEQ ID NO:58: FAM-AACCTTCATCCTCCCA), 1,5 мкл 10 % (мас/об.) PVP-40 і H₂O до 13,5 мкл на одну реакцію. Решта характеристик аналізу і циклу ПЛР були такими, як описано для аналізу кПЛР-РЧ FatBA в прикладі 11.1.1.

Розмір отриманого амплікона складав 678 п. н. Ця послідовність кДНК перекриває інтрон довжиною 76 п. н. на основі геномної послідовності. Крім того, зворотний праймер конструювали з перекриванням інтрона, таким чином, сприяючи ампліфікації кДНК FatB5, таким чином, усуваючи ампліфікацію геномної ДНК.

11.2 Аналіз експресії мРНК тубуліну

Цей аналіз проводили, як описано в прикладі 4.3.

11.3 Аналіз експресії мРНК ZFP TF

Аналіз мРНК ZFP TF зразків калюсів T₀ проводили відповідно до прикладу 4.4. Розмір ампліконів в цьому аналізі складав менше 1 т. п. н. залежно від розміру ZFP в кожній з конструкцій. Кількісний аналіз експресії ZFP TF в рослинах T₀ проводили з використанням аналізу на основі активуючого домену VP16, як описано нижче. Суміш для кПЛР-РЧ VP16 для ампліфікації кДНК ZFP TF складали наступним чином: 7,5 мкл 2X основного буфера LIGHTCYCLER® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину праймера VP16_UPL_F1 (SEQ ID NO:59: TCGATCTTGATATGTTGGGAGA), 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину VP16_UPL_R1 (SEQ ID NO:60: AGGTGCAGAATCATGTGGTG), 0,15 мкл зонда UPL № 85 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), 1,5 мкл 10 % (мас./об.) PVP-40 і H₂O до 13,65 мкл. Розмічали прийнятний квадрант(и) 384-ямкового мікропланшета і заповнювали в об'ємі 13,5 мкл основної суміші на ямку. Потім до планшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугі для мікропланшетів Qiagen. Додавали 1,5 мкл розморожених розведених перших ланцюгів кДНК з наступним додаванням 1,5 мкл стандартів плазмідної кДНК з концентрацією ДНК в контрольних ямках від найменшої до найбільшої. Герметизуючу фольгу міцно прикріплювали до планшета і центрифугували. Програму ПЛР проводили в системі для ПЛР з детекцією в реальному часі LIGHTCYCLER® 480 Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) з використанням наступних умов: 1) активація при 95 °C протягом 5 хвилин; 2) денатурація при 95 °C протягом 10 сек. (@ 4,8 °C/сек.); 3) відпал/елонгація при 60 °C протягом 25 сек. (@ 2,5 °C/сек.); 4) добудова при 72 °C протягом 1 сек. (@ 4,8 °C/сек.); 5) повторення етапів 2-4 ще 39-49 разів. На закінчення реакційну суміш охолоджували до 38 °C протягом 5 сек. для зупинки реакції.

Розмір амплікона VP16 складав 68 п. н. Цей розмір фрагмента відповідає фрагменту VP16, продукції якого очікували при ПЛР ампліфікації.

11.4 Аналіз експресії зразків калюсів

Трансгенні лінії калюсів, які вирощуються з відбором на HERBIACE®, за допомогою кПЛР-РЧ аналізували на рівні експресії FatBA, FatB5, тубуліну і ZFP TF. Ген тубуліну служив як еталонний ген для нормалізації рівнів експресії мРНК FatBA, FatB5 і ZFP TF. Для нормалізації експресії мРНК розраховували відношення FatB4/тубулін і FatB5/тубулін. Результати для складів конструкцій rDAB4691 демонстрували статистично значне підвищення експресії мРНК FatBA і мРНК FatB5 (p=0,005; fig. 9). Лінії калюсів з rDAB4692 демонстрували тренд до підвищення експресії мРНК FatBA і FatB5, але цей тренд не був статистично значимим. В окремому експерименті також аналізували лінії калюсів з rDAB4689, які продемонстрували тренд до підвищення експресії, але результати не були статистично значимими (дані не показані). В контрольних лініях специфічний амплікон ZFP TF не ампліфікувався, підтверджуючи, що аналіз ZFP TF був специфічний тільки для експресуючих ZFP TF ліній.

Приклад 12: Аналіз експресії зразків трансгенних рослин T₀

12.1 Аналіз актину у V. parus для застосування як внутрішнього контролю для кПЛР-РЧ

Зі всіх ліній виділяли тотальну РНК і синтезували кДНК, як описано в прикладі 11. Суміш ПЛР для ампліфікації кДНК актину складали наступним чином (Bo Yang et al., 2007, Plant Science 173:156-171; номер доступу гена актину в GeneBank AF111812): 7,5 мкл 2X основний буфер LIGHTCYCLER® 480 SYBR Green I, 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину праймера BN_Actin_F (SEQ ID NO:61: ACGAGCTACCTGACGGACAAG), 0,3 мкл 10 мкМ маточного розчину BN_Actin_R (SEQ ID NO:62: GAGCGACGGCTGGAAGAGTA), 1,5 мкл 10 % (мас/об.) PVP-40 і H₂O

в достатньому для отримання 13,5 мкл об'ємі. Розмічали прийнятний квадрант(и) 384-ямкового мікропланшета і заповнювали в об'ємі 13,5 мкл основної суміші на ямку. До планшета несильно прикріплювали герметизуючу фольгу. Планшет центрифугували протягом 1 хвилини при 3000 об./хв. в центрифугі для мікропланшетів Qiagen. Додавали 1,5 мкл розморожених розведених перших ланцюгів кДНК з наступним додаванням 1,5 мкл стандартів плазмідної кДНК з концентрацією ДНК в контрольних ямках від найменшої до найбільшої. Герметизуючу фольгу міцно прикріплювали до планшета і центрифугували. Програму ПЛР проводили в системі для ПЛР з детекцією в реальному часі LIGHTCYCLER® 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) з використанням наступних умов: 1) активація при 95 °C протягом 10 хвилин; 2) денатурація при 95 °C протягом 10 сек. (@ 4,8 °C/сек.); 3) відпал/елонгація при 60 °C протягом 20 сек. (@ 2,5 °C/сек.); 4) добування при 72 °C протягом 20 сек. (@ 4,8 °C/сек.); 5) повторення етапів 2-4 ще 39-49 разів. На закінчення реакційну суміш охолоджували до 38 °C протягом 5 сек. для зупинки реакції. Розмір отриманого амплікона складав 80 п. н.

12.2 Аналіз експресії мРНК FatBA і FatBS

Рослини *B. napus*, трансформовані pDAB4689-pDAB4691, аналізували на підвищену експресію мРНК FatBA і FatB5. Крім того, застосовували два типи контролю. Нетрансгенний контроль складався з рослин Nex710, які служили як негативний контроль. Також аналізували другий трансгенний контроль з рослин *B. napus* Nex710, трансформованих pDAB8210. Склад конструкції pDAB8210 містив дві генні експресійні касети. Генна експресійна касета pat (промотор AtUbi10:ген pat:3'-UTR AtuORF1) і генна експресійна касета ненаправленої нуклеази з цинковими пальцями (ZFN) (промотор AtUbi10:ген ZFAR:3'-UTR AtuORF23). Вважали, що ZFN, яка експресується в pDAB8210, не буде зв'язуватися з геномом рослин *B. napus* Nex710 і розщеплювати його, і не буде змінювати фенотип цих рослин.

Передбачувані трансгенні калюси, які вирощуються з відбором на HERBIACE®, відновлювали в рослини (приклад 3.3). Для аналізу експресії мРНК збирали зразки листя рослин *B. napus*, які вирощуються в теплиці, на стадії 6 листків. Отримували зразки шести відбитків листя з кожної рослини і перед виділенням РНК вміщували на лід. Виділяли тотальну РНК з використанням набору QIAGEN RNEASY. Синтез кДНК і наступні розведення проводили, як описано в прикладі 11. Протокол аналізу експресії FatBA і FatB5 за допомогою кПЛР-РЧ описаний вище. Спільно з аналізом проводили/не проводили аналіз експресії ZFP TF. Аналіз кПЛР-РЧ еталонного гена актину описаний вище.

Експресія генів FatBA і FatB5 листям T_0 з різними конструкціями варіювала (фіг. 10). Найбільше підвищення експресії мРНК FatBA і FatB5 спостерігали у випадках трансгенних рослин з pDAB4691, що приводило до загального підвищення експресії мРНК в 2,0-2,5 разу в порівнянні з нетрансгенними Nex710 і трансгенними контролями з pDAB8210. Експресія обох генів в порівнянні з контролями була статистично значною (нижче $p=0,05$). Таким чином, додаткове визначення характеристик конструкцій продовжували з pDAB4691.

Приклад 13: Аналіз трансгенних рослин T_1

13.1 Аналіз жирних кислот насіння T_1

У випадку pDAB4691-003-049.1 ("випадок 49") спостерігали значну відмінність вмісту C18:0 в олійних насінні з "низьким" і "високим" вмістом (Таблиця 12).

Вміст C18:0 насіння категорії з "низьким" вмістом був схожим з вмістом в лініях Nex710 (нетрансгенний контроль) і pDAB8210 (трансгенний контроль). Вміст C 18:0 в насінні з "високим" вмістом корелював з експресією ZFP TF, яка приводить до підвищення експресії гена(ів) FatB. Також спостерігали деякі підвищення C20:0, C22:0 і C24:0 на основі переходу C 18:0 в більш довголанцюжкові жирні кислоти. Вміст C 16:0 в окремих насінинах, ймовірно, не змінювався не залежно від категорій з "низьким" або високим" вмістом. Цей результат вказує на той факт, що ZFP TF pDAB4691 зв'язує і підвищує експресію гена(ів) FatB, специфічних для ферментативних реакцій перетворення C18:0-ACP в C18:0, а не реакцій перетворення C16:0-ACP в C16:0 (див. приклад 1, фіг. 1).

Таблиця 12

Профіль жирних кислот окремих насінин T₁, який змінюється
за допомогою аналізу FAME

Зразки*	Всього насичених	C16:0	C16:1	C18:0	C20:0	C22:0	C24:0
Випадок 49 Низький	6,35	4,11	0,48	1,45	0,46	0,21	0,07
Випадок 49 Низький	6,35	3,70	0,35	1,62	0,58	0,30	0,12
Випадок 49 Низький	6,49	3,64	0,36	1,66	0,62	0,32	0,18
Випадок 49 Високий	7,50	3,55	0,42	2,59	0,80	0,34	0,17
Випадок 49 Високий	7,74	3,63	0,45	2,59	0,88	0,38	0,22
Випадок 49 Високий	7,93	3,67	0,47	2,82	0,86	0,38	0,17
Випадок 49 Середній (n=24)	6,90	3,70	0,40	2,03	0,67	0,31	0,15
Випадок 49 Ст. відх. (n=24)	0,51	0,14	0,05	0,37	0,10	0,04	0,03
Nex710 Середній (n=24)	6,47	3,70	0,45	1,79	0,57	0,26	0,11
Nex710 Ст. відх. (n=24)	0,35	0,24	0,06	0,17	0,06	0,04	0,03
8210 Середній (n=150)	6,27	3,51	0,34	1,63	0,61	0,33	0,14
8210 Ст. відх. (n=150)	0,40	0,24	0,07	0,25	0,08	0,05	0,04

*Аналіз жирних кислот проводили на 24 окремих насінинах T₁ випадку 49 і Nex710, і 144 насінинах з rDAB8210, які включали випадки 6. Категорії "низький" і "високий" представляють характерний вміст FA в окремих насінинах при класифікації на основі вмісту C 18:0.

13.2 Аналіз присутності ZFP TF в рослинах T^A

У разі 49 сто насінин T₁ висаджували в теплицю. Дев'яносто сім рослин дали сходи. Кількість піків ZFP TF визначали з використанням аналізу кПЛР-РЧ rat, як описано в прикладі 6.2 для рослинного матеріалу, виділеного на стадії 2-4 листка. Випадок 49 містив декілька вставок (≈3 вставки), і в популяції T [сегрегували 0-7 піків гена rat, і таким чином, ZFP TF. У популяції T₁ ідентифікована тільки одна нуль-рослина.

13.3 Підвищення експресії мРНК FatB4 і FatB5 в рослинах T₁

Аналіз експресії природного гена FatB проводили у всіх 97 рослинах сегрегуючої популяції T₁. У дослідження як контроль включали нетрансгенні рослини Nex710, саджали в той же самий час. Отримували шість відбитків листя на кожну рослину і до можливості проведення виділення РНК вміщували на лід. Виділяли тотальну РНК з використанням набору QIAGEN RNEASY. Синтез кДНК і подальше розведення проводили, як описано в прикладі 11. Аналіз експресії FatBA, FatB5, тубуліну і VP16 (ZFP TF) проводили, як описано вище.

Статистичний аналіз відношень FatB4/FatB5 і тубуліну продемонстрував значні лінійні тренди з експресією тубуліну (фіг. 11), які вказують на те, що ріст FatB4/FatB5 не має із ростом ендогенного контролю, тубуліну, залежності 1:1. Тому в цьому аналізі відношення не використовувалися, і тубулін в моделі експресії FatB4/FatB5 включали як додаткову змінну. Для виключення будь-якої колінеарності між тубуліном і VP16 (ZFP TF), ортогоналізували матриці зв'язностей для модельних рівнянь.

До всіх наборів даних в даному дослідженні застосовували приведену нижче модель: де статус і являє собою статус трансгенності ур (трансгенна або нуль/контроль);

$$y_{ijk} = \text{статус} + \text{трансгенність} * VP16 + e_{ijk}$$

5

трансгенність*VP16 являє собою лінійну регресію від VP16, вкладену в трансгенні лінії; а e_{ijk} являє собою випадковий залишок. За умови, що для кожного зразка проводили три повторних вимірювання, застосовували структуру корельованих залишків:

$$R = \sigma_e^2 \left(I_n \otimes \begin{bmatrix} 1 & \phi & \phi \\ \phi & 1 & \phi \\ \phi & \phi & 1 \end{bmatrix} \right),$$

10

де I_n являє собою одиничну матрицю з рангом, який дорівнює кількості зразків, а ϕ являє собою кореляцію між залишками повторних вимірювань.

Результати аналізу для випадку 49 з використанням вкладених моделей регресії експресії FatBA залежно від VP16 виявили значне підвищення експресії FatBA, що демонструє високі позитивні нахили (фіг. 12, таблиця 13). Для FatB5, моделі вкладеної регресії продемонстрували позитивний нахил відносно підвищення експресії, і нахил був статистично значимим. Для випадків з підвищенням експресії потрібно зазначити, що трансформовані і контрольні рослини не формують однакою лінію, так що існує деяке зміщення лінії і ефектів трансформації.

Таблиця 13

Результати для випадків з підвищенням експресії

Випадок	Ген	Ефект ^A	Рішення	Значення P
4691-3-049.001	FatBA	Трансформована-контроль	10331,11	<0,00001
		Трансформована *VP16	0J64E-05	<0,00001
	FatB5	Трансформована-контроль	5084,09	<0,00001
		Трансформована *VP16	0,308E-05	<0,00001

^AТрансформована-контроль = різниця середньої експресії у трансформованих ліній і ліній, які не несуть трансгенів, по методу найменших квадратів.

Трансформована *VP16=регресія експресії FatB4/FatB5 залежно від експресії VP16, вкладеної в трансгенні лінії.

Потім рослини T_1 у випадку 49 сортували на основі відношень експресії FatB4/тубулін, а потім FatB5/тубулін для пошуку рослин з найбільшою експресією для отримання покоління T_2 в теплиці. Для вирощування до дозрівання вибирали вісім рослин з найбільшою експресією FatB4. Шість цих рослин також мали найбільшу експресію FatB5. Кількість піків ZFP TF у цих рослин з найбільшою експресією варіювала в діапазоні 2-4 піків, тоді як кількість піків, яка сегрегує у всьому потомстві T_1 становила 0-7 піків. У контрольних рослин до стану дозрівання для збору насіння T_2 також вирощували одну нуль-рослину випадку 49 і десять контрольних рослин Nex710.

30

13.4 Аналіз жирних кислот насіння T_2

Аналіз жирних кислот (FA) проводили в партії з 24 насінин всіх рослин, як описано в прикладі 6.1. Профіль FA однієї нуль-рослини для контролю розрахунку профілів FA об'єднували з десятьма контрольними рослинами Nex710. У середньому, для випадку 49 в порівнянні з Nex710 спостерігали 12 % збільшення вмісту C18:0 (таблиці 14A і 14B). Це збільшення було статистично значимим при $p=0,05$ (фіг. 13). Також деякий ріст продемонстрували довголанцюжкові FA, такі як C20:0, C22:0 і C24:0, що приводило до росту загального вмісту всіх насичених FA на 5 %. Оскільки фермент FatB каталізує перетворення C18:0-ACP у вільні FA C18:0, в результаті активації транскрипції FatBA і FatB5 накопичується більша кількість C18:0 (фіг. 1). pDAB4691 (приклад 6, таблиці 1 і 2) специфічна до обох генів FatB A і FatB5, що приводить до значних змін профілю FA (таблиці 14A і 14B).

40

Таблиця 14А

Профіль жирних кислот (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 і C18:3)
трансгенних і контрольних зразків Nex710 у випадку 49

S.N.	ID рослини	Всього насичених	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
1	4691-3-049 (8)	6,42	3,47	0,24	1,61	76,32	11,20	3,52
2	Nexera710 (11)	6,11	3,40	0,23	1,44	76,26	11,25	3,76

Числа в дужках в колонці 2 являють собою кількості аналізованих рослин.

Таблиця 14В

Профілі жирних кислот (C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1)
трансгенних і контрольних зразків Nex710 у випадку 49

S.N.	ID рослини	Всього насичених	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
1	4691-3-049 (8)	6,42	0,66	1,39	0,05	0,43	0,02	0,21	0,18
2	Nexera710 (11)	6,11	0,61	1,43	0,06	0,41	0,02	0,20	0,17

5 Числа в дужках в колонці 2 являють собою кількості аналізованих рослин.

Значних змін в загальному вмісті C16 при підвищенні експресії природних FatBA і FatBb не спостерігали. Ймовірно, що каталіз перетворення C16:0-ACP в C 16:0 виробляється іншими генами FatB, а не FatBA і FatB5, ілюстративними мішенями для підвищення експресії з використанням конструкції pDAB4691 з ZFP TF (фіг. 1).

10 Спостерігали, що в насінні T_i категорій з "низьким" і "високим" вмістом вміст C 16:0 окремих насінин не змінюється (таблиця 12), що вказує на той факт, що конструкція pDAB4691 з ZFP TF більш специфічно зв'язується геном(ами) FatB, які опосередковують ферментативну реакцію перетворення C18:0-ACP в C18:0, а не реакцію перетворення C16:0-ACP в C16:0 (фіг. 1).

15 Потрібно зазначити, що підвищення експресії природних генів β-кетоацил-ACP-синтетази II (приклади 1-6), що індукується ZFP TF, зумовлює різні зміни профілів FA в порівнянні з підвищенням експресії генів FatBA і FatB5. Наприклад, підвищення експресії гена β-кетоацил-ACP-синтетази II спричиняє статистично значне зниження вмісту C 16:0 і C 16:1 і одночасне збільшення вмісту всіх C18 в порівнянні з їх нуль-сегрегантами (приклад 6, фіг. 6, таблиці 5 і 8). У порівнянні з цим, опосередковане ZFP-TF підвищення експресії гена FatB спричиняє статистично значне збільшення вмісту C 18:0, але не спричиняє видимої зміни вмісту C16:0 (фіг. 14). Крім того, ці зміни профілів FA за допомогою опосередкованого ZFP TF підвищення експресії генів β-кетоацил-ACP-синтетаза II і FatB відповідно до шляху біосинтезу FA конкурують (фіг. 1).

25 Приклад 14: Отримання конструкцій ZFP TF для трансформації рослин Отримували і конструювали чотири конструкції для пригнічення транскрипції генів FatB в В. парт L (таблиця 15). Для демонстрації зниження експресії FatB використовували найкращі конструкції ZFP для підвищення експресії FatB, 13722 і 13714 (приклади 9-13). Для конструювання функціональних ZFP TF ці конструкції ZFP зливали з сигналом ядерної локалізації ораque-2 і репресуючим доменом, що складається з KRAB1 (Hanna-Rose and Hansen, 1996, Trends in Genetics, 12:229-234) або NtERF3 (Ohta et al., The Plant Cell, 2001, 13:1959-1968). Всі ці ZFP TF експресували під контролем специфічних для насіння промоторів; використовували промотор білка транспорту ліпідів 2 *Arabidopsis thaliana* (промотор AtLTP170) (Genbank ID: NC_003076) або промотор *Phaseolus vulgaris* β-фазеоліну (промотор PvPhas) (патент США № 5591605).

Докладна інформація про конструкції ZFP TF для направленої зниження експресії генів FatB

S.N.	Склад ZFP	№ конструкції	Генні касети
1	13722	pDAS5203	AtLTP170/NLS Op-2*-ZFP-13722-KRAB1/3'-UTR ORF23//AtUbi10/Pat/3'-UTR AtuORF1
2	13714	pDAS5204	AtLTP170/NLS Op-2-ZFP-13714-KRAB1/3'-UTR ORF23//AtUbi10/Pat/3'-UTR AtuORF1
3	13722	pDAS5212	PvPhas/Op-2-NLS-ZFP 13722-KRAB1/Phas 3'-UTR//AtUbi10/Pat/3'-UTR AtuORF1
4	13722	pDAS5227	AtLTP170/NLS Op-2-ZFP-13722-NtERF3/3'-UTR ORF23//AtUbi10/Pat/3'-UTR AtuORF1

*ор-2 = Сигнал ядерної локалізації Ораque-2

pDAS5203 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13722/KRAB1 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: Промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5 pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1, в донорний вектор Gateway. Отримана конструкція містила генну експресійну касету промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23. Цю конструкцію клонували в бінарну плазмиду за допомогою реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У цій реакції отримували pDAS5203 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAS5204 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13714/KRAB1 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13714/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5 pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13714/KRAB1, в донорний вектор Gateway. Отримана конструкція містила генну експресійну касету промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13714/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23. Цю конструкцію клонували в бінарну плазмиду за допомогою реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У цій реакції отримували pDAS5204 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAS5212 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13722/KRAB1 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: промотор PvPhas:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5 pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1, в донорний вектор Gateway. Отримана конструкція містила генну експресійну касету промотор PvPhas:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/KRAB1:v1 3'-UTR AtuORF23. Цю конструкцію клонували в бінарну плазмиду за допомогою реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У цій реакції отримували pDAS5212 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

pDAS5227 являє собою бінарну плазмиду, що містить генні експресійні касети NLS ораque-2/13722/NtERF3 і pat. Ця конструкція містить наступні генетичні елементи: v3 MAR RB7:промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/NtERF3:v1 3'-UTR AtuORF23:v2 промотору AtUbi10:v5 pat:v4 3'-UTR AtuORF1. Бінарну плазмиду конструювали за допомогою клонування фрагмента ДНК, що містить злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/NtERF3, в донорний вектор Gateway. Отримана конструкція містила генну експресійну касету промотор 170 AtLTP:злиття NLS ораque-2/цинковий палець 13722/NtERF3:v1 3'-UTR AtuORF23. Цю конструкцію клонували в бінарну плазмиду за допомогою реакції L-R Gateway Reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA). У цій реакції отримували pDAS5227 і підтверджували за допомогою розщеплень рестрикційними ферментами і реакцій секвенування.

Конструкції застосовували для стабільної трансформації сорту Nex710 B. napus за допомогою опосередкованої Agrobacterium трансформації гіпокотильних тканин (приклад 3.2-

3.3). Рослини T₀, що вирощуються в теплиці, піддавали самозапиленню і через чотири місяці після висадження збирали насіння T₁.

Приклад 15: Аналіз насіння T₁ трансгенних по 4 конструкціях ZFP TF

Насіння T₁ отримували у випадках перенесення трансгена (лінії) 8, 20, 37 і 15 конструкціями pDAS5203, pDAS5204, pDAS5212 і pDAS5227, відповідно. Як контроль використовували насіння п'яти рослин Nex710. Аналіз FA проводили на 24 окремих насінинах у кожному випадку перенесення трансгена з T₁ як описано раніше в прикладі 6,1, з ідентифікацією спочатку конструкції ZFP TF, яка найбільш ефективно змінює профіль FA.

15.1 Аналіз жирних кислот (FA) в насінні T₁

За допомогою конструкцій pDAS5203, pDAS5212 і pDAS5227 отримували випадки перенесення трансгена з профілями з найменшим рівнем всіх насичених FA в порівнянні з контролем Nex710 (таблиця 16). Парні відмінності між кожним з двох випадків конструкцій pDAS5203 і pDAS5212 і контролем Nex710 були значимими (p<0,005). При цьому парна відмінність pDAS5227 продемонструвала тенденцію до підвищення (p=0,06). У одному з випадків застосування pDAS5203 виявляли найменший вміст всіх насичених FA 5,3 % (не представлено) в порівнянні із середніми 6,38 % в контролі Nex710. Це являє собою 17 % зниження всіх насичених FA.

Таблиця 16A

Профіль FA в насінні T₁ в випадках перенесення трансгена декількома конструкціями

№ конструкції	Тип аналізу	Всього насичених	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
pDAS5212	Середнє (n=37)*	6,00	0,05	3,60	0,24	1,38	75,88	12,24	3,41
pDAS5212	Ст. відх. (n=37)	0,21	0,01	0,20	0,02	0,14	1,36	1,03	0,41
pDAS5212	значення p**	0,01	0,07	0,89	0,47	<0,0001	0,39	0,37	0,94
pDAS5204	Середнє (n=20)	6,26	0,05	3,52	0,25	1,65	76,33	11,52	3,58
pDAS5204	Ст. відх. (n=20)	0,29	0,01	0,15	0,02	0,16	0,78	0,66	0,30
pDAS5204	Значення P	0,43	0,72	0,52	0,69	0,32	0,16	0,04	0,34
pDAS5203	Середнє (n=8)	5,98	0,05	3,68	0,26	1,33	75,32	12,74	3,55
pDAS5203	Ст. відх. (n=8)	0,36	0,01	0,25	0,05	0,13	1,76	1,31	0,47
pDAS5203	значення P	0,02	0,06	0,45	0,96	0,000 1	0,96	0,98	0,49
pDAS5227	Середнє (n=15)	6,09	0,03	3,63	0,32	1,32	75,43	12,32	3,73
pDAS5227	Ст. відх. (n=15)	0,35	0,00	0,29	0,09	0,12	1,69	1,36	0,37
pDAS5227	значення P	0,07	0,002	0,69	0,012	<0,0001	0,84	0,48	0,1
Nex710	Середнє (n=5)	6,38	0,04	3,59	0,26	1,73	75,28	12,76	3,40
Nex710	Ст. відх. (n=5)	0,61	0,01	0,15	0,03	0,49	3,00	2,76	0,43

* Числа в дужках демонструють кількість випадків, які включені в аналіз **значення p, яке дорівнює або менше 0,05, вважали статистично значимим і розраховували з використанням програмного забезпечення JMP

Таблиця 16B

Профіль FA в насінні T₁ у випадках перенесення трансгена декількома конструкціями

№ конструкції	Тип аналізу	Всього насичених	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C24:0	C24:1
pDAS5212	Середнє (n=37)*	6,00	0,54	1,33	0,06	0,30	0,13	0,08
pDAS5212	Ст. відх. (n=37)	0,21	0,04	0,11	0,01	0,03	0,05	0,04
pDAS5212	Значення p**	0,01	0,03	0,003	0,14	0,76	0,26	0,23
pDAS5204	Середнє (n=20)	6,26	0,59	1,20	0,05	0,32	0,13	0,11
pDAS5204	Ст. відх. (n=20)	0,29	0,06	0,17	0,01	0,05	0,05	0,03
pDAS5204	Значення P	0,43	0,79	0,20	0,87	0,68	0,29	0,63
pDAS5203	Середнє (n=8)	5,98	0,51	1,28	0,05	0,29	0,12	0,11
pDAS5203	Ст. відх. (n=8)	0,36	0,03	0,15	0,01	0,02	0,01	0,05
pDAS5203	Значення P	0,02	0,006	0,048	0,42	0,56	0,55	0,84
pDAS5227	Середнє (n=15)	6,09	0,56	1,39	0,06	0,39	0,15	0,16

Таблиця 16В

Профіль FA в насінні Ті у випадках перенесення трансгена декількома конструкціями

№ конструкції	Тип аналізу	Всього насичених	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C24:0	C24:1
pDAS5227	Ст. відх. (n=15)	0,35	0,07	0,23	0,01	0,10	0,08	0,05
pDAS5227	Значення Р	0,07	0,21	0,0005	0,066	0,008	0,081	0,004
Nex710	Середнє (n=5)	6,38	0,60	1,10	0,05	0,31	0,11	0,10
Nex710	Ст. відх. (n=5)	0,61	0,13	0,09	0,01	0,07	0,05	0,08

* Числа в дужках демонструють кількість випадків, які включені в аналіз. **значення р, яке дорівнює або менше 0,05, вважали статистично значимим і розраховували з використанням програмного забезпечення JMP.

Конкретні профілі FA у випадках pDAS5203, pDAS5212 і pDAS5227 приводили до 21-25 % зниження вмісту C18:0 в порівнянні з Nex710 (фіг. 15A). Всі ці відмінності були статистично значимими при $p=0,001$ або менше (таблиця 16). Інші довголанцюжкові FA, C20:0, C22:0 і C24:0, також продемонстрували зниження концентрації. Однак змін у вмісті C 16:0 не спостерігали, що в результаті приводило до значного збільшення вмісту C16:0/C18:0 у всіх випадках перенесення трансгена конструкціями (фіг. 16B).

Профіль FA трансгенних насіння при використанні pDAS5227 продемонстрував явні відмінності в порівнянні з pDAS5203 і pDAS5212. При використанні pDAS5227 в насінні спостерігали 23 % зниження вмісту C 14:0 ($p=0,002$) і 19 % збільшення вмісту C16:1 ($p=0,01$) в порівнянні з Nex710 (фіг. 16A & B, таблиця 16). Склад ZFP TF pDAS5227 ідентичний складу pDAS5203 і pDAS5212 за винятком присутності переважного транскрипцією домену ERF3, злитому з ZFP замість домену KRAB1 (таблиця 15).

Інший склад ZFP, 13714, присутній в pDAS5204, був не таким ефективним в зниженні вмісту C18:0 в порівнянні зі складом 13722 (таблиця 16). На відміну від складу 13722, що зв'язується з обома генами FatBA і FatB5, склад 13714 зв'язується тільки з геном FatB5 (приклад 9, таблиця 10B).

15.2 Ідентифікація рослин для аналізу мРНК

Для аналізу пригнічення транскрипції FatBS вибирали два випадки перенесення трансгена, 5212[1]-004 і 5227[4]-012, отримані за допомогою трансформації конструкціями pDAS5212 і pDAS5227, відповідно. У теплиці висаджували від п'ятдесяти до ста насінин T_1 і вирощували рослини. У рослин на стадії 2-3 листків отримували чотири відбитки листя. Цей рослинний матеріал аналізували на кількість піків ZFP TF з використанням аналізу pat кПЛР-РЧ (приклад 6.2). Потім для вирощування до дозрівання для збору насіння T_2 випадковим чином вибирали нуль-рослини по ZFP і позитивні по ZFP рослини (таблиця 17). У цих рослин для аналізу мРНК FatB через 25 діб після цвітіння збирали незрілі стручки. Обидва випадки сегрегували як при наявності однієї копії. Ці випадки означали як 5212-4 і 5227-12.

Таблиця 17

Скринінг випадків перенесення трансгена на ідентифікацію позитивних по ZFP і нуль-рослин

Назва випадку	Насіння/рослини T_1	Рослина No.	Копія No.	#Рослини to T_2
5212-004	Висаджені насінини	50		
	Пророслі насінини	49		
		17	Нуль	5
	Скринінг на кількість копій pat	26	1 копія	3
		5	2 копія	4
5227-12		1	н.т.*	
	Критерій χ^2	0,04		
	Висаджені насінини	100		
	Пророслі насінини	96		
		19	Нуль	4
	Скринінг на кількість копій pat	32	1 копія	3
		27	2 копія	4

Скринінг випадків перенесення трансгена на ідентифікацію
позитивних по ZFP і нуль-рослин

Назва випадку	Насіння/рослини T ₁	Рослина No.	Копія No.	#Рослини to T ₂
Критерій χ^2		18 0,034	н.т.*	

*н.т. = Не тестували.

15.3 Проведення виділення РНК і аналізу кПЛР-РЧ

РНК виділяли з незрілого насіння Brassica з використанням набору RNeasy® для рослин, отриманого з Qiagen (Valencia, CA). Насіння вміщували в касетні пробірки, що містять буфер RLT (QiagenVP-меркаптоетанол (BME) і намістину з нержавіючої сталі. Зразки вміщували в штатив для касетних пробірок і гомогенізували при 500 ударах на хвилину протягом 5 хвилин в кульовому млині (Kleco, Visalia, CA). Штатив для пробірок перевертали на 180 градусів і гомогенізували додаткові 5 хвилин. Потім зразки переносили в 1,5 мл пробірки Eppendorf і центрифугували протягом 5 хвилин при 20000xg, і супернатант переносили в чисті пробірки. РНК виділяли, як описано в протоколі виробника (Qiagen; Valencia, CA). РНК елювали з колонок 50 мкл води, яка не містить РНКаз, і в зразках РНК визначали кількість з використанням NanoDrop 8000 з Thermo Scientific (Wilmington, DE).

Від десяти до дванадцяти мікрограм РНК обробляли ДНКазою TURBO DNA-free (каталожний номер AM1907; Applied Biosystems, Foster City, CA) в 1,5-мл пробірках, що не містять РНКаз/ДНКаз, для видалення геномної ДНК. Для кожного зразка РНК отримували п'ятдесят мікролітрів реакційної суміші, яка містить РНК, 1X буфер для ДНКазі і 2 Одиниці ДНКазі TURBO. Реакційні суміші інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин. У кожен пробірку додавали п'ять мікролітрів (5 мкл) реагенту для інактивації ДНКазі і перемішували. Зразки інкубували при кімнатній температурі протягом трьох хвилин, знов перемішували і інкубували при кімнатній температурі протягом додаткових двох хвилин. Зразки центрифугували при 20000xg протягом п'яти хвилин. Сорок мікролітрів (40 мкл) супернатанту видаляли, залишаючи нижче завис для інактивації ДНКазі. У кожному обробленому ДНКазою зразка визначали кількість з використанням Nanodrop з тим, щоб для синтезу ДНК можна було б використати еквівалентні кількості РНК.

Для кожного зразка РНК отримували комплементарну ДНК (кДНК) з використанням набору cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA). У короткому викладі, 1,5 мкг РНК використовували як матрицю в п'ятдесяти мікролітрах реакційної суміші, що містить 1X буфер для зворотної транскрипції, 1X dNTP, 1X випадкові олігомери і 125 одиниць зворотної транскриптази Multiscribe. Крім того, для кожного використання 1,5 мкг обробленої ДНКазою РНК отримували реакційні суміші без RT в тих же умовах, як указано вище, але без зворотної транскриптази Multiscribe. Всі зразки інкубували при 25 °C протягом 10 хвилин, 37 °C протягом 2 годин, 85 °C протягом 5 хвилин і протягом ночі при 4 °C.

Праймери і зонди для FATB, KASII, ERF3, KRAB1 і тубуліну конструювали з використанням програмного забезпечення Primer Express 3 з Applied Biosystems (Foster City, CA). Праймери синтезували за допомогою Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Нижче приведені послідовності праймерів:

SEQ ID NO:63: FATB5 fwd-5'-TCGCTGCCATAACAACCATTT-3';

SEQ ID NO:64: FATB5 rev-5'-CGCCTGGGTTTCCAGTCA-3';

SEQ ID NO:65: KRAB1 fwd-5'-AAGGATGTGTTCTGGATTTC-3';

SEQ ID NO:66: KRAB1 rev-5'-CACAACTCTGCTGTGCAGTATCAAG-3';

SEQ ID NO:67: ERF3 fwd-5'-GCGGGCGGGAGTTGTTA-3';

SEQ ID NO:68: ERF3 rev-5'-CCCCATCGGCGTTACATG-3';

SEQ ID NO:69: ТУБУЛІН fwd-5'-GAAGCTGAGAACAGCGATTGC-3';

SEQ ID NO:70: ТУБУЛІН rev-5'-GTTCCCTCCTCCCAACGAATG-3'.

Зонди 6FAM/MGB синтезували в Applied Biosystems (Foster City, CA):

SEQ ID NO:71: зонд 6FAM для FATB5 TTTCTCAGCCGCCA;

SEQ ID NO:72: зонд 6FAM для KRAB1 TAGGGAAGAGTGGGAAGCT;

SEQ ID NO:73: зонд 6FAM для ERF3 CAGGCCTCAGCCTT; і

SEQ ID NO:74: зонд 6FAM для тубуліну TACAAGGTTTCCAAGTTT.

Експресію генів FatB, ERF3, KRAB1 і тубуліну оцінювали за допомогою ПЛР з детекцією в реальному часі з використанням Applied Biosystem 7900HT (Foster City, CA). Для встановлення динамічної рівноваги і для ефективності аналізу отримували стандартну криву з використанням аліквот декількох зразків кДНК з різних груп. Потім з вихідного розведення робили серійне розведення 1:5 і 1:4. Кожний зразок кДНК розбавляли 1:50 10 mM Tris, pH 7,5. Реакційні суміші ПЛР отримували в об'ємі двадцяти мікролітрів, що містить 1X основну суміш для експресії генів (Applied Biosystems; Foster City, CA), 0,8 мкМ прямих і зворотних праймерів, 0,2 мкМ геноспецифічного зонда 6FAM/MGB і 4 мікролітра розбавленої кДНК. Всі реакції проводили в пристрої Applied Biosystem 7900HT з використанням програмного забезпечення SDS 2.4 в наступних умовах: Етап 1) 50 °C протягом 2 хвилин; Етап 2) 95 °C протягом 10 хвилин; Етап 3) 95 °C протягом 15 секунд; і Етап 4) 60 °C протягом 1 хвилини. Етап 3 і 4 повторювали 39 додаткових циклів. Експресію гена тубуліну оцінювали в кожному планшеті, тоді як реакції для FatB, ERF3 і KRAB1 проводили окремо. Всі реакції проводили в трьох повтореннях.

Стандартні криві оцінювали на регресію і нахил і у міру необхідності регулювали порогові значення. Зразки без RT (контролі без зворотної транскриптази, що містять РНК зі всіма компонентами для реакції отримання кДНК за винятком зворотної транскриптази) порівнювали з відповідними зразками з підтвердженням наявності відмінності Ct від 5 до 7. Дані імпортували в Excel для аналізу. Середні значення кількостей FatB, ERF3 і KRAB1 нормалізували по середній кількості тубуліну і реєстрували як відношення експресії FatB і тубуліну.

15.4 Аналіз зниження експресії мРНК специфічного для насіння FatB5 в незрілому насінні
Результати продемонстрували, що зниження експресії мРНК FatB через 25 діб після цвітіння (DAF) в незрілому насінні залежало від стану зиготності рослини Ті. Наприклад, в незрілому насінні гетерозиготних рослин (1 копія) 5227-12 видимого зниження експресії мРНК FatB5 не спостерігали (фіг. 17). Однак коли експресія ZFP TF в гомозиготних рослинах (2 копії) зростала в 2 рази, спостерігали 21 % зниження експресії мРНК FatB5 ($p=0,025$). Подібні результати отримували в іншому випадку, 5212-4, з іншою конструкцією, pDAS5212. У цьому випадку знов не спостерігали видимого зниження експресії FatBb в гетерозиготних рослинах (фіг. 18). Однак в гомозиготних рослинах при зростанні експресії ZFP TF спостерігали 15 % зменшення кількості транскриптів FatB5.

Нуль-рослини, гетерозиготні і гомозиготні рослини для двох випадків вирощували до дозрівання і визначали профілі FA в сукупності з 24 насінин кожної рослини. Цей процес сегрегації нуль-ліній з ліній, які містили ZFP TF, забезпечував відмінності в профілях FA, які більш точно відображали присутність ZFP TF.

15.4 Аналіз профілів FA в дозрілому насінні T_2
Для випадку 5227-12 профілі FA в дозрілому насінні T_2 варіювали залежно від зиготності ZFP TF батьківської рослини T_1 (таблиці 18A і 18B). Хоч гетерозиготні рослини T_1 не демонстрували ніякого видимого зниження експресії мРНК FatB в незрілому насінні на 25 DAF, профіль FA їх насіння демонстрував 8 % зниження вмісту C18:0. Значного зниження вмісту C16:0 не спостерігали. Крім того, спостерігали невелике збільшення C 18:1 (олеїнової кислоти) і FA, які йдуть далі, що приводить до загального 5,5 % зниження всіх насичених FA (таблиці 18A і 18B, фіг. 19). Коли рослини T_1 5227-12 були гомозиготними по ZFP TF, виявляли значне зниження експресії мРНК FatB. Профілі FA цього насіння T_2 відрізнялися. Спостерігали 11 % збільшення вмісту C16:1, що приводить до 2,7 % зниження всіх насичених FA (таблиці 18A і 18B). Однак додаткового зниження вмісту C18:0 в порівнянні з гетерозиготними рослинами не спостерігали. Ці зміни співпадають з профілем FA дозрілого насіння T_1 (приклад 15.1).

Таблиця 18A

Змінений профіль FA зрілого насіння T_2 у випадку 5227-12

№ рослини	Кіль- кість копій	Всього наси- чених	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 (олеї- нова)	C18:1 (вакце- нова)	Всі C18:1	C18:2	C18:3
5227-12 Середнє (n=4)	0	7,21	0,05	4,00	0,28	2,06	71,47	5,27	76,74	10,92	3,22
5227-12 Ст. відх. (n=4)	0	0,21	0,01	0,09	0,02	0,10	0,56	0,29	0,62	0,29	0,34
5227-12 Середнє (n=3)	1	6,84	0,05	3,82	0,25	1,88	71,99	4,88	76,87	11,03	3,33
5227-12 Ст	1	0,33	0,01	0,33	0,03	0,04	0,50	0,19	0,32	0,05	0,31

Таблиця 18А

Змінений профіль FA зрілого насіння T₂ у випадку 5227-12

№ рослини	Кіль- кість копій	Всього наси- чених	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 (олеї- нова)	C18:1 (вакце- нова)	Всі C18:1	C18:2	C18:3
відх. (n=3)											
5227-12 Середнє (n=4)	2	7,00	0,05	3,96	0,30	1,91	70,99	5,09	76,08	11,62	3,30
5227-12 Ст. відх. (n=4)	2	0,29	0,00	0,47	0,03	0,40	1,50	0,25	1,44	1,21	0,26

Таблиця 18В

Профіль FA зрілого насіння T₂ у випадку 5227-12

№ рослини	Кількість копій	Всього насичених	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C24:0	C24:1
5227-12 Середнє (n=4)	0	7,21	0,64	1,01	0,04	0,27	0,13	0,09
5227-12 Ст. відх. (n=4)	0	0,21	0,03	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01
5227-12 Середнє (n=3)	1	6,84	0,62	1,07	0,04	0,28	0,12	0,09
5227-12 Ст. відх. (n=3)	1	0,33	0,02	0,11	0,00	0,03	0,02	0,01
5227-12 Середнє (n=4)	2	7,00	0,62	1,06	0,04	0,27	0,12	0,08
5227-12 Ст. відх. (n=4)	2	0,29	0,09	0,03	0,01	0,03	0,03	0,01

Подібні результати отримували для профілів FA дозрілого насіння T₂ випадку 5212-4. У насінні гетерозиготних рослин спостерігали 5,5 % зниження вмісту C18:0, що приводить до зниження вмісту всіх FA на 3,2 % (таблиця 18, фіг. 20). Також спостерігали невелике зростання C18:1; інші концентрації FA, що залишилися, продемонстрували незначне зниження. Гомозиготні рослини, незважаючи на значне зниження експресії мРНК FatB, не продемонстрували більшого зниження вмісту C 18:0 в порівнянні зі зниженням вмісту C18:0 у гетерозиготних рослин.

Таким чином, в цих прикладах продемонстровано пригнічення транскрипції гена FatB5, специфічною для насіння експресією ZFP TF. ZFP TF були ефективними в здійсненні пригнічення транскрипції гена-мішені FatB5 у гомозиготних рослин T₂. Однак зниження вмісту C18:0 в гомозиготних насіннях T₂ було не більшим, ніж зниження вмісту C18:0 в сегреуючому насінні T₂. Ці результати свідчать, що гомозиготні копії ZFP TF можуть запускати механізм зворотного зв'язку з регуляцією профілів FA, оскільки гени FatB є необхідними для росту і розвитку рослин (Bonaventure et al., The Plant Cell, 2003 15:1020-1033). Заслуговує уваги, що опосередковане ZFP TF зниження експресії мРНК FatB в незрілому насінні зворотно пропорційне підвищенню експресії FatB відносно змін вмісту C18:0.

Ці приклади демонструють, що направлена на природні гени FatB дія ZFP TF специфічно змінює кількість мРНК FatB, таким чином, приводячи до специфічних і успадкованих змін профілів FA у *B. napus*.

Профілі FA насіння T₂ випадку 5212-4 при різних умовах зиготності

№ рослини	Кількість копій	Всього насичених	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
5212-4 Середнє (n=5)	0	7,02	0,05	3,94	0,32	1,88	76,03	11,17	3,50
5212-4 Ст. відх. (n=5)	0	0,29	0,01	0,18	0,02	0,12	1,44	1,06	0,56
5212-4 Середнє (n=5)	1	6,79	0,04	3,83	0,32	1,81	76,86	10,74	3,36
5212-4 Ст. відх. (n=5)	1	0,19	0,00	0,07	0,01	0,17	0,26	0,31	0,11
5212-4 Середнє (n=5)	2	6,96	0,04	3,89	0,32	1,89	76,38	11,00	3,38
5212-4 Ст. відх. (n=5)	2	0,24	0,00	0,08	0,01	0,16	0,81	0,78	0,30

Всі патенти, патентні заявки і публікації, вказані в цьому документі, таким чином, повністю включені за допомогою посилання для всіх цілей.

- 5 Хоч як ілюстрація і приклад з метою ясності розуміння наданий докладний опис, фахівцям в даній галузі очевидно, що можна здійснювати різні зміни і модифікації без відхилення від суті або об'єму опису. Таким чином, вказані вище описи і приклади не треба розглядати як обмежувальні.

Перелік послідовностей

- 10 <110>DOW AGROSCIENCES LLC et al.
 <120>КОНСТРУЙОВАНІ БІЛКИ З ЦИНКОВИМИ ПАЛЬЦЯМИ, НАПРАВЛЕНІ НА ГЕНИ РОСЛИН, ЗАЛУЧЕНІ ДО БІОСИНТЕЗУ ЖИРНИХ КИСЛОТ
 <130>8325-4006.40
 <140>PCT/US2010/002817
 15 <141>2010-10-22
 <150>61/279,528<151>2009-10-22
 <160>96
 <170>PatentIn version 3.5
 <210>1
 20 <211>38
 <212>ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 25 <400>1
 cgcggatccg aacactgcgt ttgctggctt tgatgaaa 38
 <210>2
 <211>35
 <212>ДНК
 30 <213>Штучна послідовність
 <220><223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400>2
 ctcgagctgc tactgctagt tccggtggag gagcc 35
 <210>3
 35 <211>736
 <212>ДНК
 <213>Brassica napus
 <400>3

```

gaattcgccc ttgcgcgatc cgaacactgc gtttgctggc tttgatgaaa atcttttgac 60
gtctccacgc acgagtttac gcatcccaga cgctctctta gagagaagag agagatcgag 120
atcgatttcc tccctcttaa acctctctct ctctcgtgaa tctcatttcc ctttgccgct 180
agattctctc ttcacccttt tctcgccctt ctttctctc ctcattactt ttttgctgctc 240
ttctgctctc tctctctctc agcactcttc gccatgggtg gtgctgctgc gtcttctgt 300
tacgcctctc cgctatgcac ctgggtctgc gccgctgca tgtccgtctc ccacggcggc 360
ggagattccc gacaagccgt cgctctcaaa tctaccgggc ggagtcgtcg aagcagacaa 420
cagctcacca aatgctctgg atccggtagc agcactactt cctttggggc ttgcaatcac 480
tacaatgcct tgtcttctct cttcggatcg aactctgttt ctctcaatcg aaaccagagg 540
aggttgactc gagctgctac tgctagtctc ggtggaggag ccatggctgt tgcgatggat 600
atggaaaagg aagccaaggc tgacaacaaa cctctacggc agcagcgccg ggttggtgtg 660
acaggcatgg gagttgaaac atcactaggt catgaccctg acacctttta tgagaatctc 720
ctacaagggc gaattc 736

```

5

<210>4
 <211>732
 <212>ДНК
 <213>Brassica napus
 <400>4

```

gaattcgccc ttgcgcgatc cgaacactgc gtttgctggc tttgatgaaa atgtatgtat 60
cttttgacgt ctccacgtac gagtttacgc atccagacgc ctcgtagag agaagagaga 120
gatcgagatc gagatcgaga tcgatttcc cctctctctc ctctgaatc tcatttcccc 180
ttaccgctag attctctctt cacccttttc tcgccccttc ttctctcat tatttttttg 240
tcgtctcttg ctctctcaca gcaactctct ctttagctat ggtgggtggg gctgcgtctt 300
cttctgttta cgcctctccg ctatgcacct ggttcgtcgc tgcctgcatg tccgtctccc 360
acggcggcgg agattcccga caagccgtct cctcaaata taccgggcgg agtcgtcgaa 420
gcagacgaca gtcacccaaa tgcttggtc tttctggatc cggtagcgtt caggaggctc 480
tcgtcactac ttcttttggg ccttgcaatc actacaatgc cttgtcttct ctcttcggat 540
cgaactctgt ttctctcaat cgaaaccaga ggaggttgaa tctggctgct gctagtccg 600
gtggaggagc catggctggt gcgatggata tgcaaaagga agccaagggt gacaacaaac 660
ccccacgga gcagcgccgt gttgtggtga caggcatggg agttgaaaca tcaactaggct 720
aagggcgaat tc 732

```

10

<210>5
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>

15

223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400> 5

```

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Val
1 5

```

<210>6
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 5 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400> 6
 Gln Lys Ile Asn Leu Gln Val
 1 5
 10 <210>7
 <211>7
 <212> БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 15 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>7
 Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu
 1 5
 <210>8
 <211>7
 20 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>8
 Thr Arg Ser Ser Arg Ile Asn
 1 5
 25 <210>9
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 30 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>9
 Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
 1 5
 <210>10
 <211>7
 35 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>10
 Arg Ser Asp His Leu Ser Ala
 1 5
 <210>11
 <211>7
 <212>БЛОК
 45 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>11
 Thr Ser Ser Ser Arg Ile Asn
 1 5
 50 <210>12
 <211>7
 <212>БЛОК

<213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>12
 Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
 1 5
 5
 <210>13
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>13
 Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
 1 5
 10
 <210>14
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>14
 Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
 1 5
 15
 <210>15
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>15
 Arg Asn Ala His Arg Thr Thr
 1 5
 20
 <210>16
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220><223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>16
 Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
 1 5
 25
 <210>17
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>17
 Arg Ser Asp His Leu Ser Glu
 1 5
 30
 <210>18
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>18

Gln Lys Ala Asn Arg Thr Lys
1 5

<210>19
<211>7
<212>БЛОК
5 <213>Штучна послідовність
<220>
<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
<400>19
Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
1 5

10 <210>20
<211>7
<212>БЛОК
<213>Штучна послідовність
<220>
15 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
<400>20
Thr Ser Ala Asn Leu Ser Arg
1 5

20 <210>21
<211>7
<212>БЛОК
<213>Штучна послідовність
<220>
<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
<400>21
Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys
1 5

25 <210>22
<211>7
<212>БЛОК
<213>Штучна послідовність
30 <220>
<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
<400>22
Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg
1 5

35 <210>23
<211>7
<212>БЛОК
<213>Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
40 <400>23
Asp Lys Ser Asn Arg Lys Lys
1 5

45 <210>24
<211>18
<212>ДНК
<213>Штучна послідовність
<220>
<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
<400>24
cgtggagacg tcaaaaga

50 <210>25
<211>20
<212>ДНК

	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400>25	20
5	aaggaagggc gaaaaagg	
	<210>26	
	<211>17	
	<212>ДНК	
10	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 26	17
	agatgcgtaa caggaag	
15	<210>27	
	<211>17	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
20	<400>27	17
	ctaccgggcg gagtcgt	
	<210>28	
	<211>20	
	<212>ДНК	
25	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>28	20
	ttgactcgag ctgctactgc	
30	<210>29	
	<211>20	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
35	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>29	20
	tttccatata catcgcaaca	
40	<210>30	
	<211>447	
	<212>ДНК	
	<213>Brassica napus	
	<400>30	60
	actcagcact cttcgccatg gtgggtgctg ctgcgtcttc ctgttaacga tctccgetat	
	gcacctgggt cgtcgccgcc tgcattgtccg tctcccacgg cggcggagat tcccgaacaag	120
	ccgtcgctct caaatctacc gggcggagtc gtcgaagcag acaacagctc accaaatgct	180
	ctggatccgg tagcagcact acttcctttg ggccttgcaa tcaactacaat gccttgtctt	240
	ctctcttcgg atcgaactct gtttctctca atcgaaacca gaggagggtg actcgagctg	300
	ctactgctag ttccgggtgga ggagccatgg ctgttgcgat ggatatggaa aaggaagcca	360
	aggttgacaa caaacctcct acggagcagc gccgggttgt tgtgacaggc atgggagttg	420
	aaacatcact aggtcaaggg cgaattc	447

	<210>31	
	<211>19	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
5	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>31	
	acagcgattg cctacaagg	19
10	<210>32	
	<211>22	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
15	<400>32	
	agatgggttaa gatcaccaaa gg	22
20	<210>33	
	<211>24	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>33	
	aaggaagagg aaggagtcta acag	24
25	<210>34	
	<211>18	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
30	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>34	
	cttctgctct ccaccgta	18
35	<210>35	
	<211>24	
	<212>ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>35	
40	ggtcaacgga tcaggatatt cttg	24
45	<210>36	
	<211>20	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400> 36	
	ccatgttggc aaaggcaacc	20
50	<210>37	
	<211>29	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
55	<400>37	
	acaagagtgg attgatgatc tagagaggt	29
	<210>38	

	<211>29		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
5	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>38		
	ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt		29
	<210> 39		
	<211>29		
10	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
	<400>39		
15	ccagcgtgaag caataccagc cacaacacc		29
	<210>40		
	<211>23		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>40		
	cctctctacc accgtctcac atg		23
	<210>41		
25	<211>20		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
30	<400>41		
	gatctggccg gactgtttca		20
	<210>42		
	<211>25		
	<212>ДНК		
35	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
	<400>42		
	cgctcctcag ctaccacctc aacca		25
40	<210>43		
	<211>22		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
45	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>43		
	tcgatcttga tatgttgga ga		22
	<210>44		
	<211>20		
50	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>44		
55	aggtgcagaa tcatgtggtg		20
	<210>45		
	<211>16		

	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд	
5	<400>45	
	ttgatggtga agatgt	16
	<210>46	
	<211>718	
10	<212>ДНК	
	<213>Brassica napus	
	<400>46	
	gaattcgccc ttcgcggatc cgaacactgc gtttgctggc tttgatgaaa gcttgatatgt	60
	atgtatcttt tgacgtctcc acgtacgagt ttacgcatcc agacgcctcg ttagagagaa	120
	gagrgagatc gagatcgaga tcgagatcga tttcctccct ctctctctcg tgaatctcat	180
	ttcccccttac cgctagattc tctcttcacc cttttctcgc ccttcttctt cctcattatt	240
	tttttgctgt cttctgctct ctcwcakcwc tcwkcwctct tmgcyatggt gggtgstgct	300
	gcgtcttctt cctgttacgc atctccgcta tgcacctggt tcgtcgcygc ytgcatgtcc	360
	gtctcccacg gcggcggaga ttcccgacaa gccgtckcyc tcaaactctac cgggcggagt	420
	cgtcgaagca gacaacagct caccaaagtc tctggatccg gtagcagcac tacttccttt	480
	gggccttgca atcactacaa tgccttgtct tctctcttcg gatcgaactc tgtttctctc	540
	aatcgaaacc agaggaggtt gamtcgwgt gctctgcta gttccgggtg aggagccatg	600
	gctgttgca tggatatgca aaaggaagcc aaggttgaca acaaaccctt tacggagcar	660
	cgccgtgttg tggtgacagg catgggagtt gaaacatcac taggtcaagg gcgaattc	718
15	<210>47	
	<211>28	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
20	<400>47	
	aacgaaagga gatcgagaga ggagagag	28
	<210>48	
	<211>28	
25	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400> 48	
	cgaaagggag atcgagagag gcaccgca	28
30	<210>49	
	<211>28	
	<212>ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
35	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400>49	
	aaggagaact ttaggggttg gggagact	28
	<210>50	
	<211>28	
40	<212>ДНК	

	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400>50	
5	aaggagaatt ttagggtttg gggagact	28
	<210>51	
	<211>28	
	<212>ДНК	
10	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
	<400>51	
	ctccgaagag attggcgtaa cacttcgt	28
	<210>52	
15	<211>28	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
20	<400>52	
	ctccgaagag attggcgtaa ccttcatt	28
	<210>53	
	<211>21	
	<212>ДНК	
25	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>53	
	ctttgaacgc ttatcttcct c	21
30	<210>54	
	<211>20	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
35	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>54	
	ttccacaaca tctccccaag	20
	<210>55	
40	<211>14	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд	
	<400>55	
45	ctcaggctcc accc	14
	<210>56	
	<211>21	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
50	<220>	
	<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400> 56	
	ctttgaaagc tcatcttcct c	21
	<210>57	
55	<211>20	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	

	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400> 57		
	ttccacaaca tctccccaag		20
5	<210>58		
	<211>16		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
10	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
	<400>58		
	aaccttcata ctccca		16
	<210>59		
	<211>22		
15	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>59		
	tcgatcttga tatgttgga ga		22
20	<210>60		
	<211>20		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
25	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400> 60		
	aggtgcagaa tcatgtggtg		20
	<210>61		
30	<211>21		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
35	<400> 61		
	acgagctacc tgacggacaa g		21
	<210>62		
	<211>20		
	<212>ДНК		
40	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>62		
	gagcgacggc tggaagagta		20
45	<210>63		
	<211>21		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
50	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер		
	<400>63		
	tcgctgccat aacaaccatt t		21
	<210>64		
	<211>18		
55	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		

	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>64	
	cgctgggtt tccagtca	18
5	<210>65	
	<211>22	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
10	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>65	
	aaggatgtgt tcgtggattt ca	22
	<210>66	
	<211>24	
	<212>ДНК	
15	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>66	
	cacaatctgc tgtgcagtat caag	24
20	<210>67	
	<211>17	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
25	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>67	
	gcgggcggga gttgtta	17
	<210>68	
	<211>18	
30	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>68	
35	ccccatcggc gttacatg	18
	<210>69	
	<211>21	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
40	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
	<400>69	
	gaagctgaga acagcgattg c	21
	<210>70	
45	<211>20	
	<212>ДНК	
	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер	
50	<400>70	
	gttcctcctc ccaacgaatg	20
	<210>71	
	<211>14	
	<212>ДНК	
55	<213>Штучна послідовність	
	<220>	
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд	

	<400>71		
	tttctcagcc gcc		14
	<210>72		
	<211>18		
5	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
	<400>72		
10	tagggaagag tggaagct		18
	<210>73		
	<211>14		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
15	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
	<400>73		
	caggcctcag cctt		14
	<210>74		
20	<211>18		
	<212>ДНК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд		
25	<400> 74		
	tacaagggttt ccaagttt		18
	<210>75		
	<211>7		
	<212>БЛОК		
30	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид		
	<400>75		
	Arg Ser Asp Asn Leu Ser Ala		
	1 5		
35	<210>76		
	<211>7		
	<212>БЛОК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
40	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид		
	<400>76		
	Gln Ser Ala His Arg Lys Thr		
	1 5		
	<210>77		
	<211>7		
45	<212>БЛОК		
	<213>Штучна послідовність		
	<220>		
	<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид		
	<400>77		
	Gln Ser Ser His Arg Lys Thr		
50	1 5		
	<210>78		
	<211>7		
	<212>БЛОК		
	<213>Штучна послідовність		
55	<220>		

<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>78
 Arg Ser Asp His Leu Ser Val
 1 5
 <210>79
 5 <211>7
 <212>БЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 10 <400>79
 Gln Asn Ala His Arg Ile Glu
 1 5
 <210>80
 <211>7
 <212>БЛОК
 15 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>80
 Arg Ser Asp His Leu Ser Lys
 1 5
 20 <210>81
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 25 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>81
 Gln Asn Ala Asn Arg Ile Thr
 1 5
 <210>82
 <211>7
 30 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>82
 Arg Ser Asp His Leu Ser Thr
 1 5
 35 <210>83
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 40 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>83
 His Ser Asn Thr Arg Lys Asn
 1 5
 <210>84
 45 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 50 <400>84
 Arg Ser Asp His Leu Ser Gln
 1 5
 <210>85

<211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 5 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>85
 Asn Ser Ala Ser Arg Lys Asn
 1 5

 <210>86
 <211>7
 10 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>86
 Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
 1 5

 15 <210>87
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 20 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>87
 Asn Ser Asp Ser Leu Thr Glu
 1 5

 25 <210>88
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 30 <400> 88
 Arg Arg Ala Asp Leu Ser Arg
 1 5

 <210>89
 <211>7
 <212>БЛОК
 35 <213>Штучна послідовність
 <220>
 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400> 89
 Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala
 1 5

 40 <210>90
 <211>7
 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність
 <220>
 45 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид
 <400>90
 Gln Asn Ala His Arg Lys Thr
 1 5

 <210>91
 <211>7
 50 <212>БЛОК
 <213>Штучна послідовність

<220>

<223>Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400>91

Arg Asn Ala Asp Arg Ile Thr
1 5

5 <210>92

<211>200

<212>БЛОК

<213>Штучна послідовність

<220>

10 <223>Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид

<220>

<221>misc_feature

<222>(1) ... (200)

<223>Ця область може містити від 5 до 200 залишків "Gly"

15 <400>92

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
195 200

<210>93

<211>1693

<212>ДНК

<213>Brassica napus

<400>93

5

ctcgagctgc	tactgctagt	tccggtggag	gagccatggc	tgttgcgatg	gatatggaaa	60
aggaagccaa	ggttgacaac	aaacctccta	cggagcagcg	ccgggttggt	gtgacaggca	120
tgggagttga	aacatcacta	ggtcatgacc	ctgacacctt	ttatgagaat	ctcctacaag	180
gcaacagtgg	tattagccag	attgagaatt	ttgattgttc	tgcttttcct	acgagaattg	240
ctggagagat	caagtcattc	tgcactgaag	ggtgggttgc	tccaaaactc	tcaaagagga	300
tggacaagtt	catgctctat	cttctcactg	ctggcaagaa	ggctttgggt	gatgggtggg	360
taaccgaaga	agtcattggc	gagtttgaca	aagccaaatg	cggagtcttg	attggctctg	420
caatgggagg	catgaaggtc	tttcaagatg	ctattgaagc	tatgaagatc	tcttacaaga	480
agatgaatcc	tttctgtgtg	cctttcgoga	caacgaacat	gggttctgct	atgcttgctt	540
tggatctggg	atggatgggg	ccaaactatt	ctatctcaac	tgcttgtgca	acaagcaact	600
tttgattctt	caattcagca	aaccacatta	tcaaaggaga	agctgatgta	atgctctgtg	660
gtggctcgga	ttcagttatt	attccaatag	ggttgggagg	ttttgttgca	tgccgtgctc	720
tttctcaaag	gaataatgat	cccacaaaag	cttcacgccc	ttgggatagc	aaccgagatg	780
gtttcgtgat	gggagaggga	gctggagttt	tgcttttgga	agagcttgaa	catgctaaga	840
aaagaggagc	aacaatctat	gcagagttcc	ttggtgggag	tttcacatgt	gatgcctatc	900
acatgaccga	gcctcgccct	gatggtgctg	gtgtgattct	gtgtattgag	agagcattgg	960
ctgatgctgg	gatttccaaa	gaacagataa	actatataaa	tgacacatgca	acctctacac	1020
cagctggaga	ccttaaggag	taccaagccc	ttgctcactg	ctttggccaa	aatcctgaga	1080
taaaagttaa	ttccacaaaa	tctatgattg	gacacttgct	gggagctgct	ggggccgttg	1140
aagctgtcgc	aactgtgcag	gccataagga	ccggatgggt	tcatccaaat	atcaaccttg	1200
agagtccaga	caatggagtg	gatacaaatt	tgctgggtggg	tcctgagaag	gagagattgg	1260
acattaaagc	agccttgtca	aattcattcg	ggtttggtgg	ccacaactcc	agcatcattt	1320
ttgctcctta	caagtgaag	cactcattgc	ctgtactcca	aaactgggtg	tgtaacttgc	1380
tgtaagtgtt	tacaagaact	ccccatgtta	tgttgttgcg	ggaatcaaca	cagtttggtta	1440

5

aactaccaag agctaagcta agtttcctta ggatcaagat ccgtttgtgc cagagaactt	1500
ggacaaagag caaacgtagc agagtttgga tttagcttcc gtgtgatacc ttttgagtgg	1560
aatctttgta gccttttctt ttttgtagtg tttcatttct atttgttaat cattacaatc	1620
tgaaaattgc caaaccaatt ctccgttaaa tttagtaact ctacacaaaa aaaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaaa aaa	1693

<210>94

<211>1767

<212>ДНК

<213>Arabidopsis thaliana

<400>94

attctctctt cttctcttca cccatttctc gttttctcct ttgttctctc atctgggttc	60
ttctcaaagc ctcttctctt ttttgccatg gtgggtgcgt ctctctctta cgcctctccg	120
ttatgtacct ggtttggtgc tgcttgcag tccgtctctc acggtggagg agatagccgt	180
caggctggtg ctcttcaatc tgggtggcgg agtcggcgaa ggaggcagct tagcaaatgc	240
tctgtcgctt ctggatccgc tagcattcag gctctcgta cttcttggtt ggattttggt	300
ccttggtact actacaacaa caacaatgca ttgtcttctc tctttggatc gaatagtgtt	360
tctttgaatc gaaaccagag gagattgaat cgtgctgcta gctccggtgg agccatggca	420
gtgatggaga tggaaaagga agctgcgggt aacaagaaac cacctacgga gcagcgtcga	480
gttgtagtga caggcatggg agttgaaaca tcattgggtc atgaccaca taccttctat	540
gagaatttgc tacaaggcaa cagtggatt agccagattg aaaattttga ttgttctgaa	600
tttctacgc gaattgcggg agagatcaaa agcttctcga ctgaaggatg ggttgctcca	660
aaactttcta aaaggatgga caaatcctat ctctatcttc tcacagctgg taagaaagct	720
ttggctgatg gtgggggttac tgatgaagta atggcagagt ttgacaaaac caaatgtgga	780
gttttgattg gctcggaat gggaggaatg aaggctcttt acgatgctat tgaagctctg	840
agaatctctt acaagaagat gaatcctttt tgtgtacctt ttgcgacaac aaacatgggt	900
tctgctatgc ttgccatgga tctgggatgg atggggccaa actattctat ttcaactgct	960
tgtgccacaa gcaacttttg cattctgaat tcagcaaacc acattattaa aggtgaagct	1020
gatgtaatgc tctgtggtgg ctcatagca gttattattc caatagggtt gggagggttt	1080
gttgcatgcc gggctcttct acaaaggaat aatgatccca caaaagcttc acgtccttgg	1140
gataccaatc gagatggttt cgtgatggga gagggagctg gagttctact tttggaagaa	1200
ctcgagcatg ctaagaaaag aggtgcaact atctacgcag agttcctcgg tgggagtttc	1260
acatgtgatg cctatcacat gaccgagcct caccctgatg gggctggtgt tattctctgt	1320
attgagagag cgtagctag tgctgggatt tccaaggaac aaataaatta cataaatgca	1380
catgcaacct caacgcagtc tggagatatt aaggaatacc aagcccttgc tcaactgttt	1440
ggccaaaatc ctgagcttaa ggtaaatcc acaaaatcta tgattggaca cttgctggga	1500
gctgctgggg ccgtggaggc tgttgcaact gtgcaggcga tacggaccgg atgggttcat	1560

caaatatca acctcgagaa tccagacagt ggagtggata caaagctgct ggtgggtcct 1620
 agaaggaga gactggacat taaagcagcc ttgtcaaatt cattcggggtt tgggtggcat 1680
 actccagca tcattttttgc tccttacaag tgaaagcgaa agcagttgct tgtactccaa 1740
 cctgattgt ataacttgct gtaaggt 1767

<210>95

<211>893

<212>ДНК

5 <213>Brassica rapa

<400>95

gacatggata ttttctgaga tttggaagtg tggatttgat ataagcaaag caaagcaagt 60
 gctcgcttgt atgtatcttt tgacgtctcc acgcacgagt ttacgcatcc agacgcctcg 120
 ttagagagaa gagagagatc gagatcgatt cctccctctt aaacctctct ctctctcggtg 180
 aatctcattt ccccttaccg ctgattcttc tcttcacctt tttctcgccc ttccttcctt 240
 ctctcatta cttttttgtc gtcttctgct ctctctctct ctccagcactc ttcgcttttag 300
 ctatgggtggg tgctgctgcg tcttctgct acgcactctcc gctatgcacc tgggttcgtcg 360
 ctgcctgcat gtccgtctcc cacggcgggcg gagattcccg acaagccgtc gctctcaaat 420
 ctacggggcg gagtcgtcga agcagacaac aactcaccaa atgctctgga tccggtagca 480
 gcgttcagca ggctctcgtc actacttctt ttgggccttg caatcactac aatgccttgt 540
 cttctctctt cggatcgaa cctgtttctc tcaatcgaaa ccagaggagg ttgactcgag 600
 ctgctactgc tagttccggt aatttaacat ttcaccaatc tgggtttttg atttgtgggt 660
 attgtttgca gagttgacaa gctttgtttt tgtagtaaa gtttctcttt ttatgtgttt 720
 atgttatattg gtcaaatgat tcaacttgga gatcaagttt aacgggaaag tatgctgatt 780
 tggaatctca gcttaattgt caagtttcat tctttattgt gtgtgtaata tgcaaagcac 840
 atttctgtga gtttgattca atattggact ctgataagg agtatgatga tac 893

<210>96

<211>812

<212>ДНК

10 <213>Brassica oleracea

<400>96

acggcacttt acgcaccaat atataccata tggtagccag ttaagggtag gaagtgattt 60
 tccccctttt ttatgtatac agactccaat tccccaaatt tactctgggtc atcgaacatc 120
 gatacgtttg tatgtatgta cgtcttatct ctctctctgg ctatctctgt gtgttttggt 180
 gttaataaca ggaggttttg ttttgttttt ttgacgtct ccacgcacga ttttaagcct 240
 ccgttacgct ctgcacgcct cctgaaagag agagagagag agatcgaatc atcttaatta 300
 aacctctctc gtgaatccgc tagattctct cttcacggtt ttctcgctc tcctctctc 360
 tccattttgt tttcttcttc ttcgtcttct tcttcttgcc attgccatgg tgggtgctgc 420
 tgcgtcttcc tgttacgcat ctcccttatg caccttcttc gttgctgctt gcatgtccct 480

```

ctctcacggc ggcggtgata cccgtcaagc ctttgggcgg agccgtcgaa ggagacaaca      540
gctcggcaaa tgctctggat cggtagcat tctcgtgtct tcttgtttgg agtttaagcc      600
ttgcagtcac tacaacaaga acaacaagg caatgccttt cctctcctcg gatcgaatag      660
cctttctctg aatcgaaagc agaggaaact gaatcgagca acttcttctt ctcccggtat      720
aaacattctt ctcccaaat ctcaagtctt ggtttctggg tatcgtttgc aagctgacaa      780
gctttgtttt ttgtgtataa agtttctctt tt                                     812

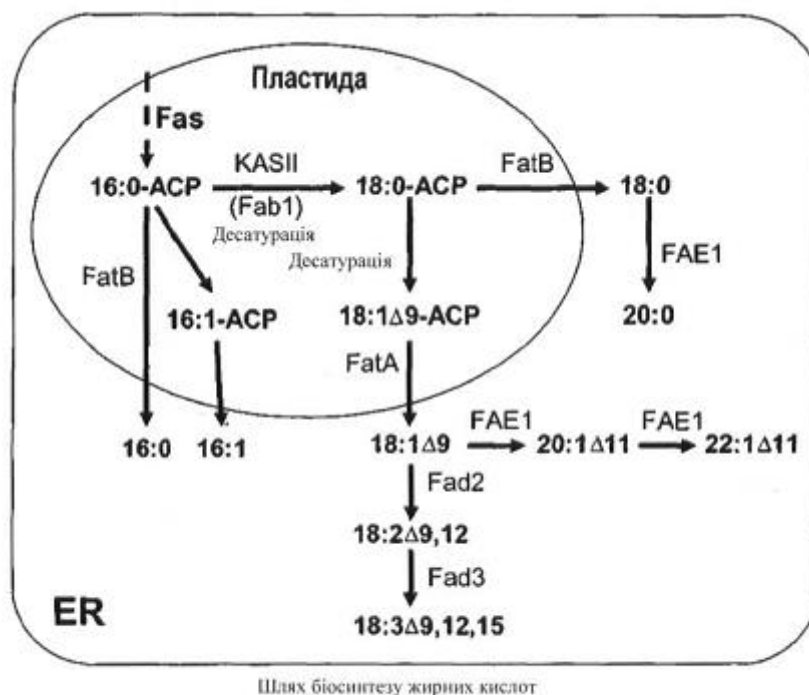
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Неприродний білок з цинковими пальцями, що модулює експресію ендogenous гена тіоестерази жирних кислот В (*FatB*) рослин, де білок з цинковими пальцями містить області розпізнавальних спіралей, як показано в кожному рядку наступної Таблиці:

ZFP	1	2	3	4	5	6
13685	RSDNLSA (SEQ ID NO:75)	QSAHRKT (SEQ ID NO:76)	RSDDLK (SEQ ID NO:21)	QSSHRKT (SEQ ID NO:77)	RSDHLSV (SEQ ID NO:78)	QNAHRIE (SEQ ID NO:79)
13714	RSDNLSA (SEQ ID NO:75)	QSAHRKT (SEQ ID NO:76)	RSDDLK (SEQ ID NO:21)	QSSHRKT (SEQ ID NO:77)	RSDHLSK (SEQ ID NO:80)	QANARIT (SEQ ID NO:81)
13722	RSDHLST (SEQ ID NO:82)	HSNTRKN (SEQ ID NO:83)	RSDHLSO (SEQ ID NO:84)	NSASRKN (SEQ ID NO:85)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	QSGHLSR (SEQ ID NO:86)
13743	NSDSLTE (SEQ ID NO:87)	RRADLSR (SEQ ID NO:88)	RSDSLSA (SEQ ID NO:89)	QNAHRKT (SEQ ID NO:90)	RSDHLSO (SEQ ID NO:84)	RNADRIT (SEQ ID NO:91)

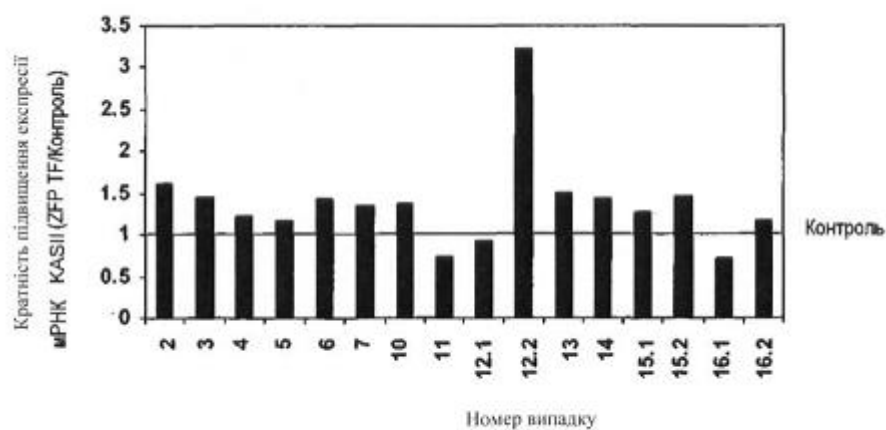
- 10 2. Злитий білок, що містить білок з цинковими пальцями за п. 1 і функціональний домен.
3. Злитий білок за п. 2, де функціональний домен являє собою домен регуляції транскрипції або домен розщеплення.
4. Білок з цинковими пальцями або злитий білок за будь-яким з пп. 1-3, де ген рослини міститься в рослині *Brassica*.
- 15 5. Білок з цинковими пальцями за п. 4, де білок з цинковими пальцями зв'язується з ділянкою-мішенню, як представлено в таблиці 10A.
6. Полінуклеотид, що кодує один або більше білків з цинковими пальцями або злитих білків за будь-яким з пп. 1-5.
7. Спосіб модифікації одного або більше генів *FatB* у рослинній клітині, де спосіб включає:
- 20 введення в рослинну клітину одного або більше експресуючих векторів, що містять щонайменше один полінуклеотид за п. 6, так, що експресуються один або більше білків з цинковими пальцями і модифікують один або більше генів *FatB*.
8. Спосіб за п. 7, де активована експресія щонайменше одного гена *FatB*.
9. Спосіб за п. 7, де репресована експресія щонайменше одного гена *FatB*.
- 25 10. Спосіб за п. 7, де полінуклеотид кодує нуклеази з цинковими пальцями і розщеплюється щонайменше один ген.
11. Спосіб за п. 10, який додатково включає етап введення донорної нуклеїнової кислоти так, що донорний вектор за допомогою гомологічної рекомбінації вбудовується у ділянку розщеплення.
- 30 12. Рослинна клітина, яка містить щонайменше один ген *FatB*, модифікований будь-яким зі способів за будь-яким з пп. 7-11.
13. Рослинна клітина за п. 12, де клітина знаходиться в насінні, і вміст жирних кислот в насінні модифікований.
14. Рослина, яка містить щонайменше одну клітину за п. 12 або 13.
- 35 15. Насіння рослини за п. 14.
16. Потомство рослини за п. 14.



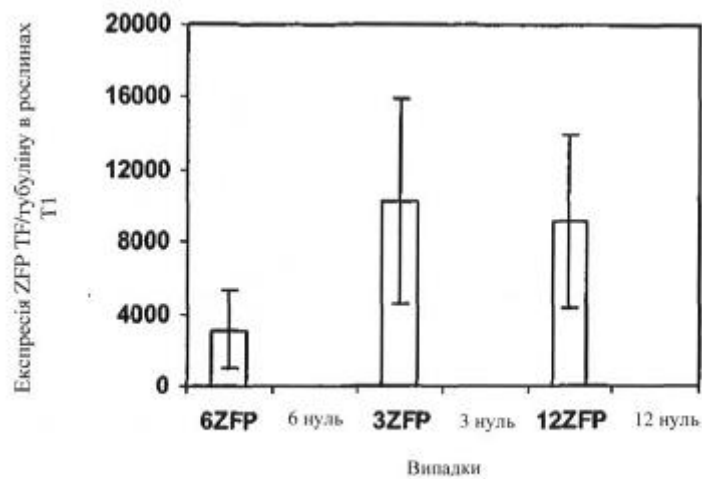
Фиг. 1



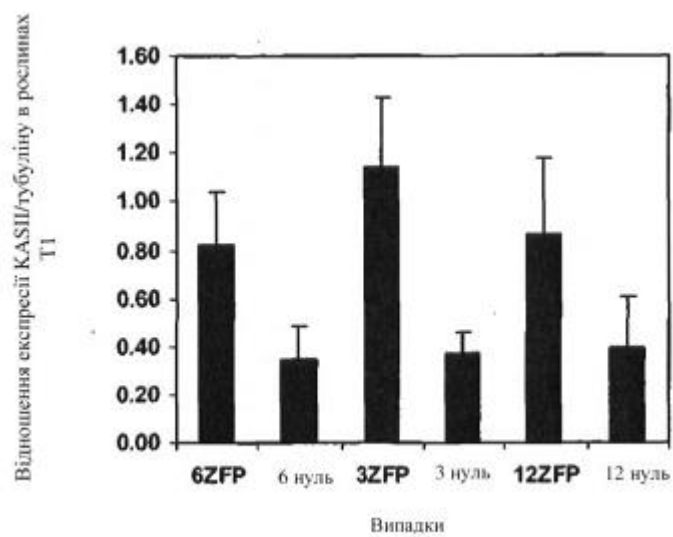
Фиг. 2



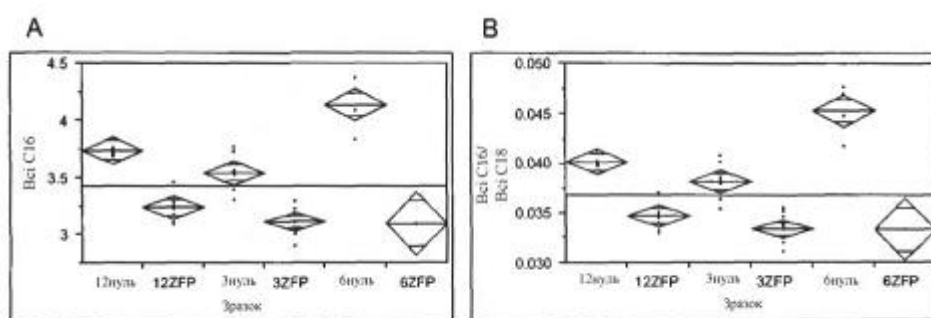
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

		1	50
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(1)	ATTCTCTCTTCTTCTTCACCCATTCTCTCGCTTTCTCCTTTGTTCTCTC	
Консенсус	(1)	-----	
		51	100
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(51)	ATCTGGGTTCTTCTCAAAGCCTCTTCTTTTTTTGCCATGGTGGGTGCGT	
Консенсус	(51)	-----	
		101	150
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(101)	CTTCCTCTTACGCATCTCCGTTATGTACCTGGTTTGTGCTGCTTGCATG	
Консенсус	(101)	-----	
		151	200
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(151)	TCCGTCTCTCACGGTGGAGGAGATAGCCGTCAGGCTGTTGCTCTTCAATC	
Консенсус	(151)	-----	
		201	250
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(201)	TGGTGGGCGGAGTCGGCGAAGGAGGCAGCTTAGCAAATGCTCTGTGCTT	
Консенсус	(201)	-----	
		251	300
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(251)	CTGGATCCGCTAGCATTGAGGCTCTCGTCACTTCTTGTGTTGGATTTTGGT	
Консенсус	(251)	-----	
		301	350
AF244520	(1)	-----	
AF318307	(301)	CCTTGTA CTCACTACAACAACAATGCATTGTCTTCTCTTTGGATC	
Консенсус	(301)	-----	
		351	400
AF244520	(1)	-----CTGGAGCTGCTACTGCT	
AF318307	(351)	GAATAGTGTTTCTTTGAATCGAAACCAGAGGAGATTGAATCG-TGCTGCT	
Консенсус	(351)	-----T GA G T CTGCT	
		401	450
AF244520	(18)	AGTTCCGGTGGAGGAGCCATGGCTGTTCGATGGATATGGAAAAGGAAGC	
AF318307	(400)	AGCTCCGGTGGAG--GCCATGGCAGT--GATGGAGATGGAAAAGGAAGC	
Консенсус	(401)	AG TCCGGTGGAG GCCATGGC GT GATGGA ATGGAAAAGGAAGC	
		451	500
AF244520	(68)	CAAGGTTGACAAACAACCTCTACGGAGCAGCGCGGGTTGTTGTGACAG	
AF318307	(444)	TGCGGTTAACAAGAAACCACTACGGAGCAGCGTCGAGTTGTAGTGACAG	
Консенсус	(451)	GGTT ACAA AAACC CCTACGGAGCAGCG CG GTTGT GTGACAG	
		501	550
AF244520	(118)	GCATGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCATGACCCCTCAACCTTTATATGAG	
AF318307	(494)	GCATGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCATGACCCCACTACCTTTATATGAG	
Консенсус	(501)	GCATGGGAGTTGAAACATCA T GGT CATGACCC A ACCTT TATGAG	
		551	600
AF244520	(168)	AATCTCTACAAAGGCAACAGTGGTATTAGCCAGATTGAAATTTTGATTG	
AF318307	(544)	AATTTGCTACAAAGGCAACAGTGGTATTAGCCAGATTGAAATTTTGATTG	
Консенсус	(551)	AAT T CTACAAAGGCAACAGTGGTATTAGCCAGATTGA AATTTTGATTG	
AF244520	(218)	TTCTGCTTTTCTACGGAATTTGCTGGAGAGATCAAGTCAATCTCGACTG	
AF318307	(594)	TTCTGAATTTCTACGGAATTTGCTGGAGAGATCAAAAGCTCTCTCGACTG	
Консенсус	(601)	TTCTG TTTCTACG GAATTTGC GGAGAGATCAA TTCTCGACTG	
		651	700

Фиг. 7А

AF244520	(268)	AAGGTTGGGTTGCTCCAAAAC	TC	AAAGGATGGACAA	TTTCATGCTC	
AF318307	(644)	AAGGTTGGGTTGCTCCAAAAC	TC	AAAGGATGGACAA	TTTCATGCTC	
Консенсус	(651)	AAGG TGGGTTGCTCCAAAAC	TC	AA AGGATGGACAA	TTTCATGCTC	
		701			750	
AF244520	(318)	TATCTTCTCAC	GCTGG	AAGAA	GCTTTGG	TGATGGTGGGGT
AF318307	(694)	TATCTTCTCAC	GCTGG	AAGAA	GCTTTGG	TGATGGTGGGGT
Консенсус	(701)	TATCTTCTCAC	GCTGG	AAGAA	GCTTTGG	TGATGGTGGGGT
		751			800	
AF244520	(368)	AGAAGT	ATGGCAGAGTTTGACAAA	CCAAATG	GGAGT	TTGATTGGCT
AF318307	(744)	TGAAGT	ATGGCAGAGTTTGACAAA	CCAAATG	GGAGT	TTGATTGGCT
Консенсус	(751)	GAAGT	ATGGCAGAGTTTGACAAA	CCAAATG	GGAGT	TTGATTGGCT
		801			850	
AF244520	(418)	C	GCAATGGGAGG	ATGAAGGTCTTT	A	GATGCTATTGAAGCT
AF318307	(794)	C	GCAATGGGAGG	ATGAAGGTCTTT	A	GATGCTATTGAAGCT
Консенсус	(801)	C	GCAATGGGAGG	ATGAAGGTCTTT	A	GATGCTATTGAAGCT
		851			900	
AF244520	(468)	ATCTCTTACAAGAAGATGAATCCTTT	TGTGT	CCTTT	CGCACAAC	AA
AF318307	(844)	ATCTCTTACAAGAAGATGAATCCTTT	TGTGT	CCTTT	CGCACAAC	AA
Консенсус	(851)	ATCTCTTACAAGAAGATGAATCCTTT	TGTGT	CCTTT	CGCACAAC	AA
		901			950	
AF244520	(518)	CATGGGTTCTGCTATGCTTGCT	TGGATCTGGGATGGATGGGGCCAACT			
AF318307	(894)	CATGGGTTCTGCTATGCTTGCT	TGGATCTGGGATGGATGGGGCCAACT			
Консенсус	(901)	CATGGGTTCTGCTATGCTTGCT	TGGATCTGGGATGGATGGGGCCAACT			
		951			1000	
AF244520	(568)	ATTCTAT	TCAACTGCTTGTGC	ACAAGCAACTTTTGCATTCT	AATTCA	
AF318307	(944)	ATTCTAT	TCAACTGCTTGTGC	ACAAGCAACTTTTGCATTCT	AATTCA	
Консенсус	(951)	ATTCTAT	TCAACTGCTTGTGC	ACAAGCAACTTTTGCATTCT	AATTCA	
		1001			1050	
AF244520	(618)	GCAAACCACATTAT	AAAGG	GAAGCTGATGTAATGCTCTGTGGTGGCTC		
AF318307	(994)	GCAAACCACATTAT	AAAGG	GAAGCTGATGTAATGCTCTGTGGTGGCTC		
Консенсус	(1001)	GCAAACCACATTAT	AAAGG	GAAGCTGATGTAATGCTCTGTGGTGGCTC		
		1051			1100	
AF244520	(668)	GGATT	CAGTTATTATTCCAATAGGGTTGGGAGGTTTGTTCATGCCCG			
AF318307	(1044)	GGATT	CAGTTATTATTCCAATAGGGTTGGGAGGTTTGTTCATGCCCG			
Консенсус	(1051)	GAT	CAGTTATTATTCCAATAGGGTTGGGAGGTTTGTTCATGCCCG			
		1101			1150	
AF244520	(718)	CTCTTT	C	CAAAGGAATAATGATCCACAAAAGCTTCACG	CCTTGGGAT	
AF318307	(1094)	CTCTTT	C	CAAAGGAATAATGATCCACAAAAGCTTCACG	CCTTGGGAT	
Консенсус	(1101)	CTCTTT	C	CAAAGGAATAATGATCCACAAAAGCTTCACG	CCTTGGGAT	
		1151			1200	
AF244520	(768)	ACCAAT	CGAGATGGTTTCGTGATGGGAGAGGGAGCTGGAGTT	T	CTTTT	
AF318307	(1144)	ACCAAT	CGAGATGGTTTCGTGATGGGAGAGGGAGCTGGAGTT	T	CTTTT	
Консенсус	(1151)	A	CAA	CGAGATGGTTTCGTGATGGGAGAGGGAGCTGGAGTT	T	CTTTT
		1201			1250	
AF244520	(818)	GGAAGA	CT	GA	CATGCTAAGAAAAGAGG	GCAAC
AF318307	(1194)	GGAAGA	CT	GA	CATGCTAAGAAAAGAGG	GCAAC
Консенсус	(1201)	GGAAGA	CT	GA	CATGCTAAGAAAAGAGG	GCAAC
		1251			1300	
AF244520	(868)	TCCT	GGTGGGAGTTTCACATGTGATGCCTATCACATGACCGAGCCTC			
AF318307	(1244)	TCCT	GGTGGGAGTTTCACATGTGATGCCTATCACATGACCGAGCCTC			
Консенсус	(1251)	TCCT	GGTGGGAGTTTCACATGTGATGCCTATCACATGACCGAGCCTC			
		1301			1350	

Fig. 7B

AF244520	(918)	CCTGATGGT GCTGGTGT ATTCT GTATTGAGAGAGCA TTGCTGATGC	
AF318307	(1294)	CCTGATGGT GCTGGTGT ATTCT GTATTGAGAGAGCA TTGCTGATGC	
Консенсус	(1301)	CCTGATGG GCTGGTGT ATTCT GTATTGAGAGAGC TT GCT TGC	1351 1400
AF244520	(968)	TGGGATTTCCAA GAACA ATAAA CTAA ATAAATGCACATGCAACCTCA	
AF318307	(1344)	TGGGATTTCCAA GAACA ATAAA CTAA ATAAATGCACATGCAACCTCA	
Консенсус	(1351)	TGGGATTTCCAA GAACA ATAAA TA ATAAATGCACATGCAACCTC A	1401 1450
AF244520	(1018)	CAACAGCTGGAGACCTTAAGGAGTACCAAGCCCTTGCTCACTGCTTTGGC	
AF318307	(1394)	CAACAGCTGGAGATTAAGGAGTACCAAGCCCTTGCTCACTGCTTTGGC	
Консенсус	(1401)	C C GCTGGAGA TTAAGGA TACCAAGCCCTTGCTCACTG TTTGGC	1451 1500
AF244520	(1068)	CAAAATCCTGAGATTAAGGTAAATTCCACAAAATCTATGATTGGACACTT	
AF318307	(1444)	CAAAATCCTGAGCTTAAGGTAAATTCCACAAAATCTATGATTGGACACTT	
Консенсус	(1451)	CAAAATCCTGAG T AA GT AATTCCACAAAATCTATGATTGGACACTT	1501 1550
AF244520	(1118)	GCTGGGAGCTGCTGGGGCCGTGAGGCTGTGCAACTGTGCAGGCATATA	
AF318307	(1494)	GCTGGGAGCTGCTGGGGCCGTGAGGCTGTGCAACTGTGCAGGCATATA	
Консенсус	(1501)	GCTGGGAGCTGCTGGGGCCGT GA GCTGT GCAACTGTGCAGGC ATA	1551 1600
AF244520	(1168)	GGACCGGATGGGTTTCAATCCAAATATCAACCTTGAGAGTCCAGACATGGA	
AF318307	(1544)	GGACCGGATGGGTTTCAATCCAAATATCAACCTTGAGAGTCCAGACATGGA	
Консенсус	(1551)	GGACCGGATGGGTTTCAATCCAAATATCAACCT GAGA TCCAGACA TGGA	1601 1650
AF244520	(1218)	GTGGATACAAATTTGCTGGTGGGTCTGAGAAGGAGAGATTGGACATTAA	
AF318307	(1594)	GTGGATACAAATTTGCTGGTGGGTCTGAGAAGGAGAGATTGGACATTAA	
Консенсус	(1601)	GTGGATACAAA TGCTGGTGGGTCT AGAAGGAGAGA TGGACATTAA	1651 1700
AF244520	(1268)	AGCAGCCTTGTCAAATTCATTGCGGTTTGGTGGCCAACTCCAGCATCA	
AF318307	(1644)	AGCAGCCTTGTCAAATTCATTGCGGTTTGGTGGCCAACTCCAGCATCA	
Консенсус	(1651)	AGCAGCCTTGTCAAATTCATTGCGGTTTGGTGG CA AACTCCAGCATCA	1701 1750
AF244520	(1318)	TTTTTGCTCCTTACAAGTGAAAGC - ACTCA - TTGCTGTACTCCAAACC	
AF318307	(1694)	TTTTTGCTCCTTACAAGTGAAAGC - ACTCA - TTGCTGTACTCCAAACC	
Консенсус	(1701)	TTTTTGCTCCTTACAAGTGAAAGC A CA TTGC TGTACTCCAAACC	1751 1800
AF244520	(1365)	TGCTTGTGTAACCTTGCTGTAAGTGTATTACAAGAACTCCCCATGTTATGTT	
AF318307	(1744)	TGCTTGTGTAACCTTGCTGTAAGTGTATTACAAGAACTCCCCATGTTATGTT	
Консенсус	(1751)	TG TTGT TAACCTTGCTGTAAG GT	1801 1850
AF244520	(1415)	GTTCGGGAATCAACACAGTTTGTAAACTACCAAGAGCTAAGCTAAGTT	
AF318307	(1768)	-----	
Консенсус	(1801)	-----	
		1851 1900	
AF244520	(1465)	TCCCTAGGATCAAGATCCGTTTGTGCCAGAGAACTTGGACAAAGAGCAAA	
AF318307	(1768)	-----	
Консенсус	(1851)	-----	
		1901 1950	
AF244520	(1515)	CGTAGCAGAGTTTGGATTTAGCTTCCGTGTGATACCTTTTGAGTGGAATC	
AF318307	(1768)	-----	
Консенсус	(1901)	-----	
		1951 2000	

Фиг. 7C


```

AF244520 (1565) TTTGTAGCCTTTTCTTTTGTAGTGTTCATTTCTATTTGTTAATCATT
AF318307 (1768) -----
Консенсус (1951) -----
                2001                                2050
AF244520 (1615) ACAATCTGAAAATTGCCAAACCAATTCTCCGTTAAATTTAGTAACTCTAC
AF318307 (1768) -----
Консенсус (2001) -----
                2051                                2079
AF244520 (1665) AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AF318307 (1768) -----
Консенсус (2051) -----

```

Фиг. 7D

```

Seq ID 3 (1) ----- 50
Seq ID 4 (1) -----
Seq ID 46 (1) -----
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (1) -----
BH723504 (1) ACGGCACCTTTACGCACCAATATATACCATATGGTAGCCAGTTAAGGGTAC
Консенсус (1) -----
                51                                100
Seq ID 3 (1) -----
Seq ID 4 (1) -----
Seq ID 46 (1) -----
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (1) -----
BH723504 (51) GAAGTGATTTTCCCTTTTCTTATGTATACAGACTCCAATTCCTCCAAATT
Консенсус (51) -----
                101                                150
Seq ID 3 (1) ----- GAATTCGCCCTT
Seq ID 4 (1) ----- GAATTCGCCCTT
Seq ID 46 (1) ----- GAATTCGCCCTT
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (1) ----- GACATTCGATATT
BH723504 (101) TACTCTGGTCATCGAACATCGATACGTTTGTATGTATGTACGTTTATCT
Консенсус (101) ----- GAATTCGCCCTT
                151                                200
Seq ID 3 (13) CGCGGA--TCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA-----
Seq ID 4 (13) CGCGGA--TCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA-----
Seq ID 46 (13) CGCGGA--TCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA--C-----
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (13) TTTGAGATTGGAAGTGTGGATTTCATATAAGCAAGCCAGCAAGTGC
BH723504 (151) CTTCTC-TGGCTATCTCTGTCTGTTTCTGTTGTTAATAAGAGGAGG---
Консенсус (151) CGCGGA TCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA
                201                                250
Seq ID 3 (51) ----- ATCTTTTGACGTCTCCACGCACGAGTTTACGCATCCA
Seq ID 4 (51) ----- ATGTATGTATCTTTTGACGTCTCCACGTTACGAGTTTACGCATCCA
Seq ID 46 (53) TTGTATGTATGTATCTTTTGACGTCTCCACGTTACGAGTTTACGCATCCA
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (63) TCGCTTGATGTATCTTTTGACGTCTCCACGCACGAGTTTACGCATCCA-
BH723504 (196) -TTTTGTTTCTGTTTCTTTGACGTCTCCACGCACGATTTTAACTCTCGT
Консенсус (201) TGTATGTATCTTTTGACGTCTCCACGCACGAGTTTACGCATCCA
                251                                300
Seq ID 3 (89) GACGCCTCGTTAGAGAGAAGAGAGAGATCGAGATCGATTTCTC--CTC
Seq ID 4 (96) GACGCCTCGTTAGAGAGAAGAGAGAGATCGAGATCGAGATCGAGATCGAT
Seq ID 46 (102) GACGCCTCGTTAGAGAGAAGAGAGAGATCGAGATCGAGATCGAGATCGAT
Seq ID 47 (1) -----
AC189461 (112) GACGCCTCGTTAGAGAGAAGAGAGAGATCGAGATCGATTTCTC--CTC
BH723504 (245) TACGCTCTGACGCTCTGTAAGAGAGAGAGAGAGATCGAA-TCATC
Консенсус (251) GACGCCTCGTTAGAGAGAAGAGAGAGATCGAGATCGAGATCGA TC TC
                301                                350

```

Фиг. 8A

Seq ID 3	(137)	T T A A A C C T C T C T C T C T C G T G A A T C T C A T T T C C C T T T G C G C T -	A G A T T
Seq ID 4	(146)	T T C C T C C - C T C T C T C T C G T G A A T C T C A T T T C C C C T T A C C G C T -	A G A T T
Seq ID 46	(152)	T T C C T C C - C T C T C T C T C G T G A A T C T C A T T T C C C C T T A C C G C T A -	G A T T
Seq ID 47	(1)	-----	
AC189461	(159)	T T A A A C C T C T C T C T C T C G T G A A T C T C A T T T C C C C T T A C C G C T -	A G A T T
BH723504	(294)	T T A A T T A - - A A C T C T C T C G T G A A - T - - - - - C - - - - - C G C T -	A G A T T
Консенсус	(301)	T T A A T C C C T C T C T C T C G T G A A T C T C A T T T C C C C T T A C C G C T A G A T T	
		351	40
Seq ID 3	(186)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C C T T C C T T C T - C T C C T C A T T A T T T T T T	
Seq ID 4	(194)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C C T T C C T T C - - - - T C C T C A T T A T T T T T T	
Seq ID 46	(200)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C C T T C C T T C - - - - T C C T C A T T A T T T T T T	
Seq ID 47	(1)	-----	
AC189461	(208)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C C T T C C T T C T T C T C C T C A T T A T T T T T T	
BH723504	(327)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C T C T C C T T C T - - - - C C T C T C C A T T T T T G T T	
Консенсус	(351)	C T C T C T T C A C C C T T T T C T C G C C C T T C C T T C T C C T C A T T A T T T T T T	
		401	450
Seq ID 3	(235)	G T C G T C T T C T G C T C T C T C T C - T C T C T C - A G C A C T C - - - - T T C G C C A T G	
Seq ID 4	(240)	G T C G T C T T C T G C T C T C T C A C A G A C A C T C - T T C T C T - - - - T T A G C T A T G	
Seq ID 46	(246)	G T C G T C T T C T G C T C T C T C W C A K C W C T C - W K C W C T C - - - - T T M G C Y A T G	
Seq ID 47	(1)	- - - - - A C T C - A G C A C T C - - - - T T C G C C A T G	
AC189461	(258)	G T C G T C T T C T G C T C T C T C T C - T C T C T C - A G C A C T C T T C G C T T T A G C T A T G	
BH723504	(372)	- T - T C T T C T T C T C G T C T C T C T C T T C C A T T - - - - - G C C A T G	
Консенсус	(401)	G T C G T C T T C T G C T C T C T C T C T C T C A G C A C T C T T G C C A T G	
		451	500
Seq ID 3	(277)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C - - - - C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
Seq ID 4	(282)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C T T C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
Seq ID 46	(289)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C T T C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
Seq ID 47	(21)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C - - - - C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
AC189461	(306)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C - - - - C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
BH723504	(410)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C - - - - C T G T T A C G C A T C T C C C T T A T G C A C C T T	
Консенсус	(451)	G T G G G T G C T G C T G C G T C T T C C T G T T A C G C A T C T C C G C T A T G C A C C T G	
		501	550
Seq ID 3	(324)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
Seq ID 4	(332)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
Seq ID 46	(339)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
Seq ID 47	(68)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
AC189461	(353)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
BH723504	(457)	G T T C G T C G C G C C T G C A T G T C C T C T C C A C G G C G G C G G A T A T C C C G T C	
Консенсус	(501)	G T T C G T C G C T G C C T G C A T G T C C G T C T C C C A C G G C G G C G G A G A T T C C C G A C	
		551	600
Seq ID 3	(374)	A A G C C G T C G C T C T C A A A T C T A C C G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A G	
Seq ID 4	(382)	A A G C C G T C T C T C T C A A A T C T A C C G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A G	
Seq ID 46	(389)	A A G C C G T C C C T C A A A T C T A C C G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A G	
Seq ID 47	(118)	A A G C C G T C G C T C T C A A A T C T A C C G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A G	
AC189461	(403)	A A G C C G T C G C T C T C A A A T C T A C G G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A A	
BH723504	(507)	A A G C C G T T - T - - - - - G G G C G G A G C C G T C G A A G C A G A C A C A G	
Консенсус	(551)	A A G C C G T C G C T C T C A A A T C T A C C G G G C G G A G T C G T C G A A G C A G A C A C A G	
		601	650

Fig. 8B


```

Seq ID 3 (424) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAG-----
Seq ID 4 (432) CTCACCAAATGCTTGGCTCTTTCTGGATCCGGTAGCGTT---CAGGAGGC
Seq ID 46 (439) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAG-----
Seq ID 47 (168) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAG-----
AC189461 (453) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAGCGTTCAACAGGC
BH723504 (542) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAGTTCTCGTGTCTTC
Консенсус (601) CTCACCAAATGCT-----CTGGATCCGGTAGCAG-----G C
651 700

Seq ID 3 (453) -----CACTACTTCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT-----
Seq ID 4 (479) TCTCGTCACACTTCCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT-----
Seq ID 46 (468) -----CACTACTTCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT-----
Seq ID 47 (197) -----CACTACTTCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT-----
AC189461 (494) TCTCGTCACACTTCCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT-----
BH723504 (583) -----TTGTTTGGAGTTTATGCGCTTGCAATCACTACAACAAGAACAACA
Консенсус (651) CACTACTTCCTTTGGGCCTTGCAATCACTACAAT
701 750

Seq ID 3 (487) ---GCCTTGTCTT---CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
Seq ID 4 (519) ---GCCTTGTCTT---CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
Seq ID 46 (502) ---GCCTTGTCTT---CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
Seq ID 47 (231) ---GCCTTGTCTT---CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
AC189461 (534) ---GCCTTGTCTT---CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
BH723504 (627) AAGGCAATGCTTCTCTCTTCGGATCGAATAGCGTTTCTCTCAATCGA
Консенсус (701) GCCTTGTCTT CTCTCTTCGGATCGAACTCTGTTTCTCTCAATCGA
751 FWD-----800

Seq ID 3 (532) AACCAGAGGAGGTTGACTCGAGCTGCTACTGCTAGTCCGGTGGAGGAGC
Seq ID 4 (564) AACCAGAGGAGGTTGAAATCTGGCTG---CTGCTAGTCCGGTGGAGGAGC
Seq ID 46 (547) AACCAGAGGAGGTTGAAATCTGGCTGCTGCTAGTCCGGTGGAGGAGC
Seq ID 47 (276) AACCAGAGGAGGTTGACTCGAGCTGCTACTGCTAGTCCGGTGGAGGAGC
AC189461 (579) AACCAGAGGAGGTTGACTCGAGCTGCTACTGCTAGTCCGGTAAATTTAAC
BH723504 (677) AACCAGAGGAACTGAAATCGAGCAACTTCTTCTTCTCCGGTATTAACAT
Консенсус (751) AACCAGAGGAGGTTGACTCGAGCTGCTACTGCTAGTCCGGTGGAGGAGC
801 -----REV 850

Seq ID 3 (582) -----C---ATGGCTGTTGCGATGGATA-TGGAAAAGGAAGCCAAGGTT
Seq ID 4 (611) -----C---ATGGCTGTTGCGATGGATA-TGGAAAAGGAAGCCAAGGTT
Seq ID 46 (597) -----C---ATGGCTGTTGCGATGGATA-TGGAAAAGGAAGCCAAGGTT
Seq ID 47 (326) -----C---ATGGCTGTTGCGATGGATA-TGGAAAAGGAAGCCAAGGTT
AC189461 (629) ATTTTCA---CAATCTGGGTTTTTGATTTGTCGGTATTTGTTGACAGGTT
BH723504 (727) TCTTCTCCCAATCTCAAGTCTTGGTTTCTGGGTATCGTTTGCAG-GCT
Консенсус (801) C ATGGCTGTTGCGATGGATA TGGAAAAGGAAGCCAAGGTT
851 900

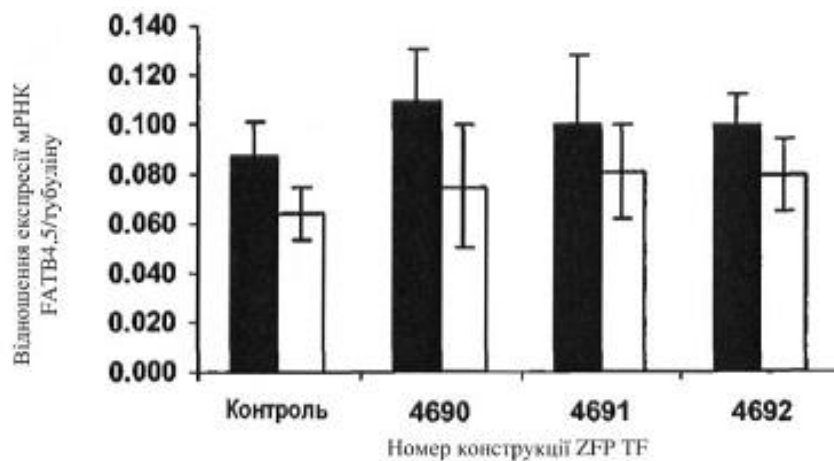
Seq ID 3 (622) GACAACAAACCTCCTACG-GAGCAGCG---CCGGTTGTTGTGACAGGCA
Seq ID 4 (651) GACAACAAACCCCTACG-GAGCAGCG---CCGTGTTGTGTTGACAGGCA
Seq ID 46 (637) GACAACAAACCCCTACG-GAGCAGCG---CCGTGTTGTGTTGACAGGCA
Seq ID 47 (366) GACAACAAACCTCCTACG-GAGCAGCG---CCGGTTGTTGTGACAGGCA
AC189461 (676) GACAAGCTTTGTTTGTG-TAGTAAAGTTTCTCTTTTATGTGTTTATGT
BH723504 (776) GACAAGCTTTGTTTGTGTTATTAAGTTTCTCTTT-----
Консенсус (851) GACAACAAACCTCCTACG GAGCAGCG CCGTGTGTTGTGACAGGCA
901 950

```

Фиг. 8С

Seq ID 3	(668)	TGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCACTGACCTGACACCTTTTATGAGAAT
Seq ID 4	(697)	TGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCAAGGGCGAATTC-----
Seq ID 46	(683)	TGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCAAGGGCGAATTC-----
Seq ID 47	(412)	TGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCAAGGGCGAATTC-----
AC189461	(725)	TATTTGGTCAANTGATTCACTTGGAGATCAGTTTAAACGGGAAAGTATG
BH723504	(813)	-----
Консенсус	(901)	TGGGAGTTGAAACATCACTAGGTCAAGGGCGAATTC
		951 1000
Seq ID 3	(718)	CTCCTACAAGGGCGAATTC-----
Seq ID 4	(733)	-----
Seq ID 46	(719)	-----
Seq ID 47	(448)	-----
AC189461	(775)	CTGATTTGGAATCTCAGCTTAATTGTCAAGTTTCATTCTTTATTGTGTGT
BH723504	(813)	-----
Консенсус	(951)	-----
		1001 1050
Seq ID 3	(737)	-----
Seq ID 4	(733)	-----
Seq ID 46	(719)	-----
Seq ID 47	(448)	-----
AC189461	(825)	GTAATATGCAAAGCACATTTCTGTGAGTTTGATTCAATATTGGACTCTAG
BH723504	(813)	-----
Консенсус	(1001)	-----
		1051 1069
Seq ID 3	(737)	-----
Seq ID 4	(733)	-----
Seq ID 46	(719)	-----
Seq ID 47	(448)	-----
AC189461	(875)	ATAAGGAGTATGATGATAC
BH723504	(813)	-----
Консенсус	(1051)	-----

Фиг. 8D



Фиг. 9

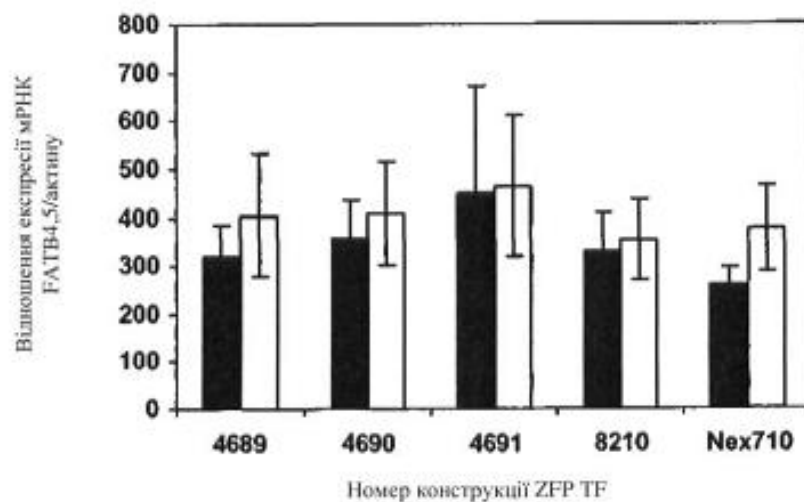


Fig. 10

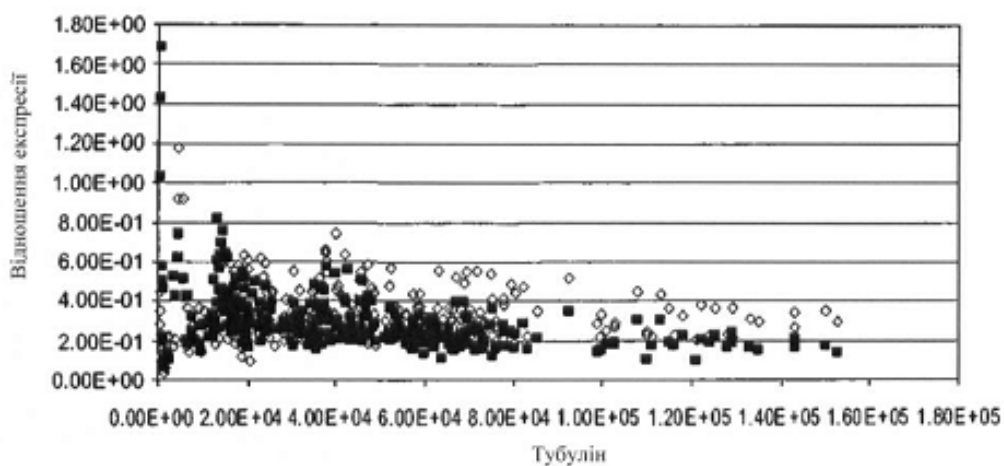


Fig. 11

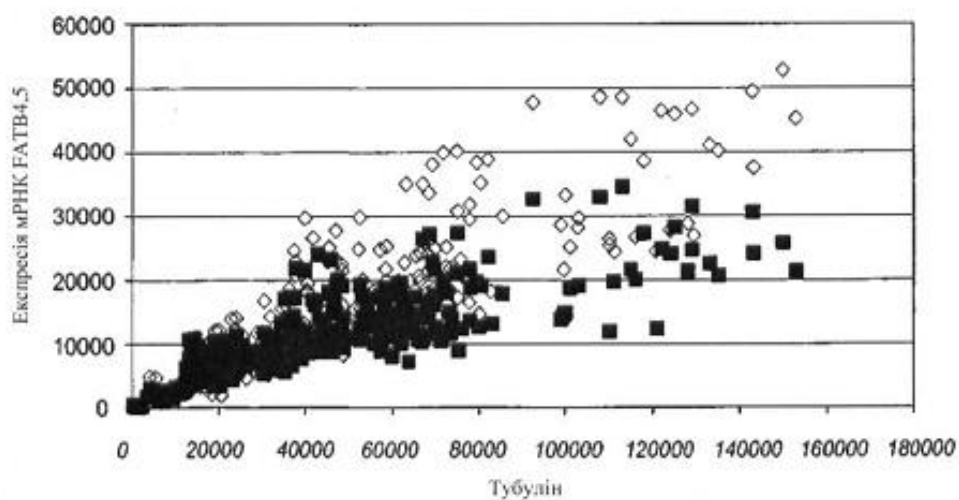


Fig. 12

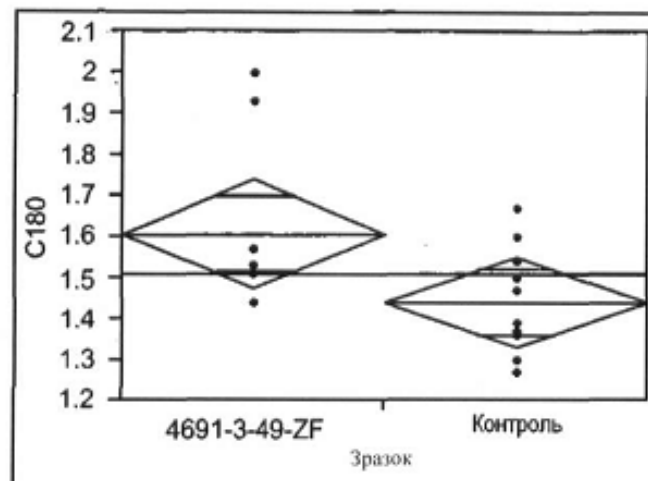


Fig. 13

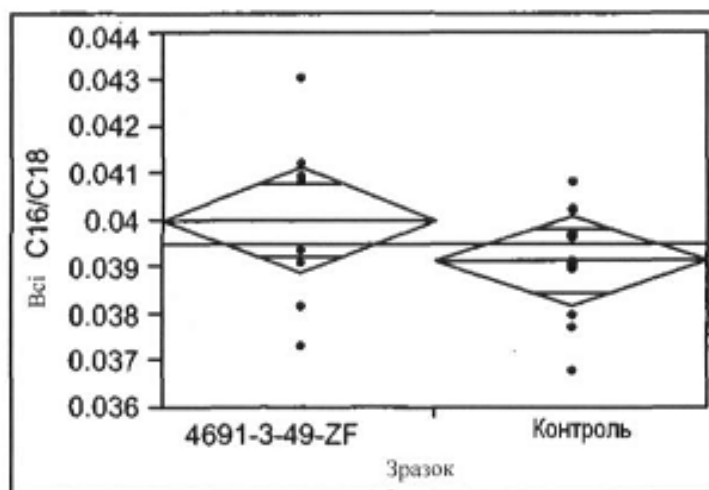


Fig. 14

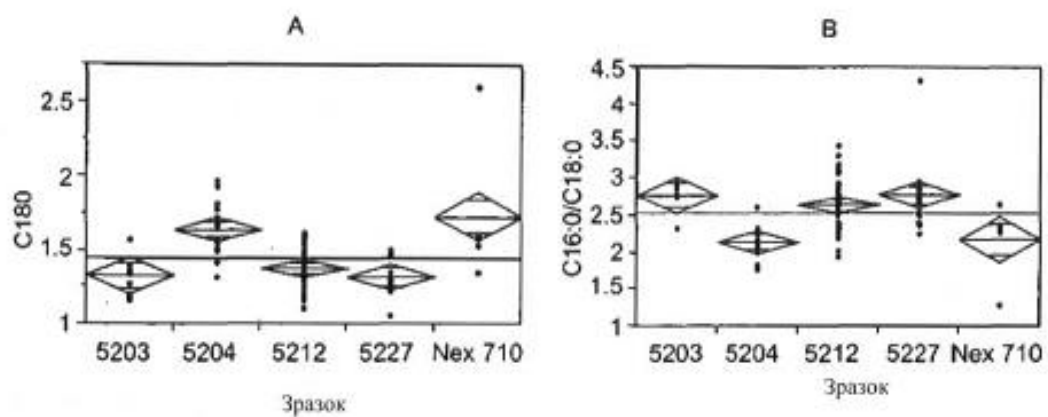


Fig. 15

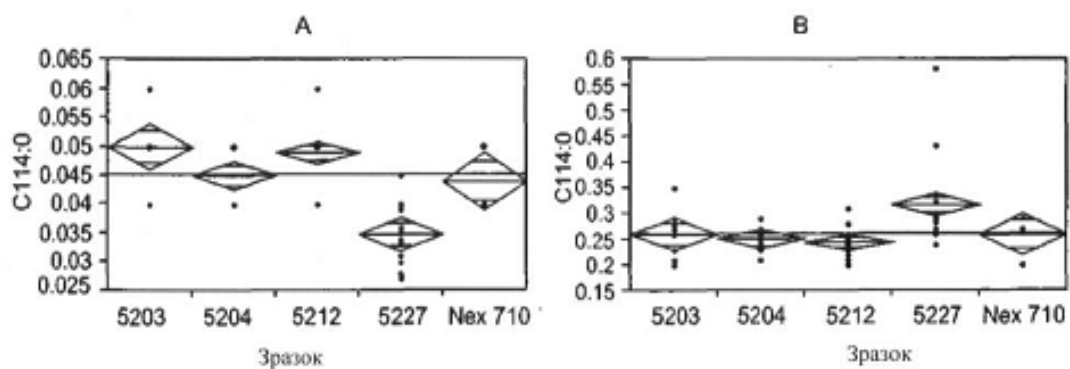


Fig. 16

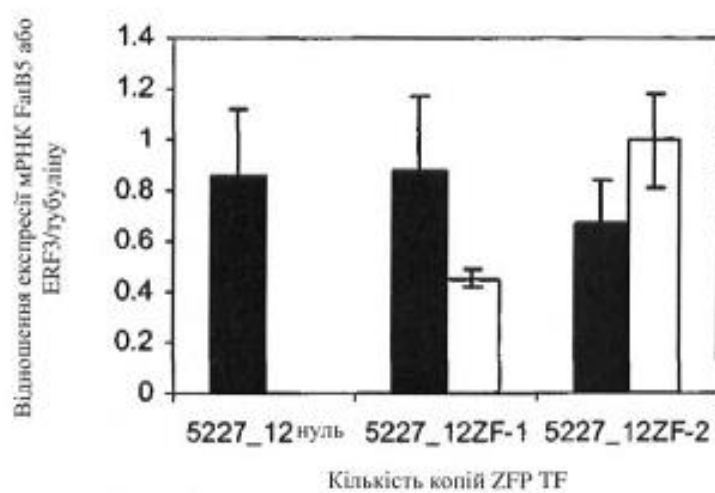


Fig. 17

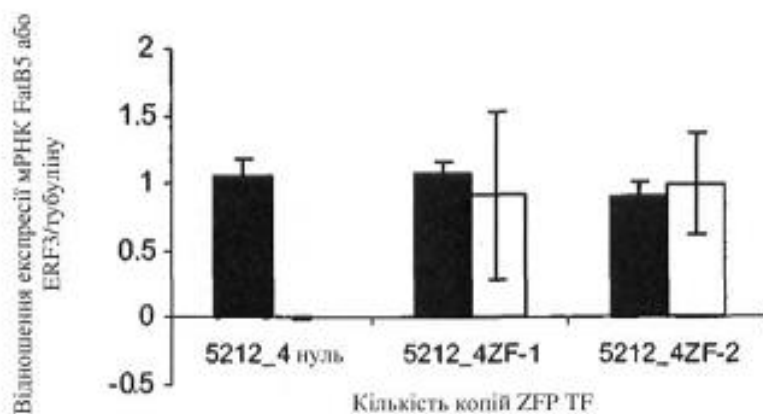
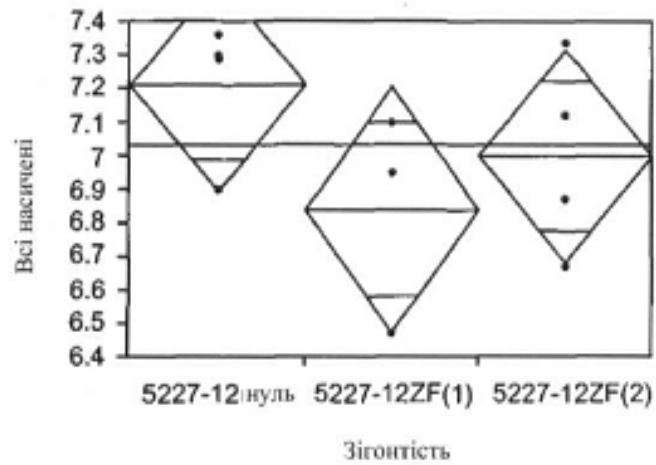
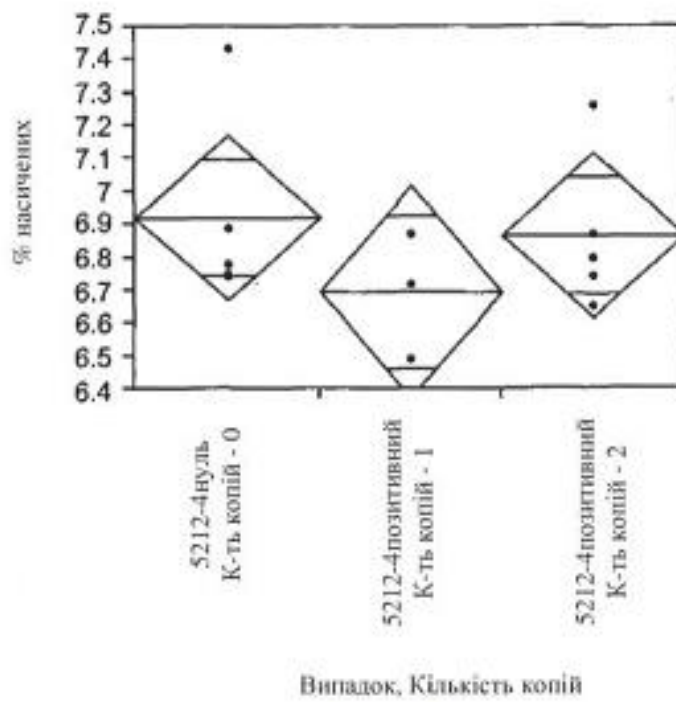


Fig. 18



Фіг. 19



Фіг. 20

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601