



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112515** (13) **C2**
(51) МПК
A01H 1/04 (2006.01)
C40B 30/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | |
|--|--|
| (21) Номер заявки: а 2011 15616 | (72) Винахідник(и): Лорі Джон (US), Флук Джошуа (US) |
| (22) Дата подання заявки: 03.06.2010 | (73) Власник(и): ДАУ АГРОСАЄНСИЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268- 1054, United States of America (US) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.09.2016 | (74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/183,777 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Marjorie L. Fournier et al., Multidimensional Separations-Based Shotgun Proteomics // Cheminform. - 2007. - Vol. 38, - № 47. - P. 1-9 S. Bhushan., Catalysis, Subcellular Localization, Expression and Evolution of the Targeting Peptides Degrading Protease, AtPreP2 // PLANT AND CELL PHYSIOLOGY. - 2005. - Vol. 46, № 6. - P. 985-996 B. Domon., Mass Spectrometry and Protein Analysis // SCIENCE. - 2006. - Vol. 312, - №5771. - P. 212-217 Wienkoop S et al., Cell-specific protein profiling in Arabidopsis thaliana trichomes: identification of trichome-located proteins involved in sulfur metabolism and detoxification // Phytochemistry. - 2004. - Vol. 65, № 11. - P. 1641-1649 US 20050153380 A1, 14.07.2005. US 20050229273 A1, 13.10.2005. WO 2007132164 A2, 22.11. 2007. US 2005153380 A1 14.07.2005. |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 03.06.2009 | |
| (33) Код держави-учасниці US Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | |
| (41) Публікація відомостей 27.02.2012, Бюл.№ 4 про заявку: | |
| (46) Публікація відомостей 26.09.2016, Бюл.№ 18 про видачу патенту: | |
| (86) Номер та дата PCT/US2010/037192, подання міжнародної 03.06.2010 заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | |

(54) СПОСІБ ВІЯВЛЕННЯ ПРИСУТНОСТІ ДВОХ АБО БІЛЬШЕ БІЛКІВ, ЩО СТАНОВЛЯТЬ ІНТЕРЕС, В ЗРАЗКАХ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу виявлення присутності двох або більше білків, що становлять інтерес, з відомими амінокислотними послідовностями в зразках рослинного походження, причому вказаний спосіб включає виділення складного білкового зразка із зразка рослинного походження, де вказаний складний білковий зразок містить множинні білки, подальше розщеплення вказаного складного білкового зразка з отриманням пептидів, розділення пептидів з використанням рідинної хроматографії - тандемної мас-спектрометрії (РХ/МС/МС), іонізацію пептидів; отримання одночасних мас-спектральних даних для пептидів; і порівняння вказаних одночасних мас-спектральних даних з мас-спектральними даними, отриманими для

UA 112515 C2

двох або більше білків, що становлять інтерес, за допомогою чого визначається присутність або відсутність двох або більше білків, які становлять інтерес.

Ця заявка вимагає пріоритет, оснований на попередній патентній заявці 61/183777, яка була зареєстрована в Бюро США по патентах і торгових знаках 3 червня 2009 р., і повне розкриття якої включене в цей документ шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Винахід, в цілому, стосується високопродуктивного аналізу ознак рослин. У деяких варіантах здійснення винахід стосується способів високопродуктивного аналізу і кількісної оцінки рослинних білків, визначеного за допомогою мас-спектрометрії з разовим уприскуванням зразків змішаного білка, витягнутого з рослин і рослинної тканини. Далі, деякі варіанти здійснення винаходу належать до способів аналізу генотипів трансгенних рослин і підтримки експресії в цих рослинах бажаних рослинних ознак.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Розширюване застосування технології рекомбінантних ДНК для отримання трансгенних рослин в комерційних і індустріальних цілях вимагає розвитку високопродуктивних способів аналізу ліній трансгенних рослин. Такі способи потрібні для збереження сортів трансгенних рослин в послідовному ряді поколінь, для попередження витікання трансгенів в навколишнє середовище, а також для допомоги в швидкому отриманні трансгенних рослин з бажаними або оптимальними фенотипами. Крім того, сучасні посібники по безпечній оцінці ГМ (генетично модифікованих) рослин, призначених для вживання людиною, вимагають їх характеристики на рівні ДНК і білка при порівнянні між батьківською і модифікованою культурою. Див. Sesikeran and Vasanthi (2008) Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17 Suppl. 1:241-44. Нові експериментальні сорти ГМ-рослин, складаються з усе складніших генетичних модифікацій, включаючи, серед іншого, стопкові гени і ознаки.

Сучасні способи аналізу трансгенних рослин, яким надається перевага в даній галузі техніки, включають: методику, основані на ДНК (наприклад, ПЛР), ОТ-ПЛР, застосування генів-репортерів, саузерн-блотинг і імунохімію. Всім перерахованим методологіям властиві різні недоліки, внаслідок чого дуже бажано знайти більш довершений спосіб, який здатний швидко і недорого ідентифікувати, а також кількісно оцінити множинні продукти трансгенів високопродуктивним чином за допомогою аналізу обмеженого зразка з трансгенної рослини.

Методики аналізу трансгенних рослин, основані на ДНК, мають декілька помітних недоліків. Незважаючи на той факт, що трансформація, опосередкована *Agrobacterium*, вважається найбільш переважним способом генетичної трансформації рослин, генотипи рослин, трансформованих *Agrobacterium*, важко аналізувати, застосовуючи методику, основані на ПЛР. Див. Nain et al. (2005) Plant Mol. Biol. Rep. 23:59-65. Присутність в трансформованих тканинах навіть слідових кількостей *Agrobacterium* приводить до оманливих результатів ПЛР. Формати Id. ампліфікації ДНК також вимагають емпіричного тестування ген-специфічних праймерів і умов термоцикування. Найбільш важливо, що підходи до скринінгу трансгенних рослин, основані на ДНК, фактично не визначають експресію білкового продукту гена. Схожим чином, ОТ-ПЛР або нозерн-блотинг можна використовувати для підтвердження присутності трансгенних транскриптів в трансгенному рослинному матеріалі. Див. Alwine et al. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5350-54; Toplak et al. (2004) Plant Mol. Biol. Rep. 22:237-50. Жоден з цих способів не підтверджує наявності фактичної експресії білка у вихідному рослинному матеріалі. Ці методики також вимагають застосування радіоактивних матеріалів і/або великих кількостей тканин і великого часу обробки.

Гени-репортери, такі як гени, що кодують флуоресцентні білки, також можуть бути котрансформовані в геноми трансгенних рослин, тобто, забезпечити інструмент для ідентифікації трансформантів. Однак гени-репортери є лише непрямыми індикаторами генетичної рекомбінації. Експресія конструкції гена-репортера не підтверджує експресію супутнього трансгена. Далі, або ген-репортер, або трансген можуть бути втрачені в подальших поколіннях рослини-хазяїна, тим самим розриваючи зв'язок між наявністю репортера і представляючого інтерес трансгена. Схожим чином, трансгени можуть відходити з рослини-хазяїна в сусідні рослини, наприклад, в результаті перехресного запилення, без одночасного відходу гена-репортера. Коли в трансгенній рослині складені стопкою множинні гени, необхідно ввести в її геном однакову кількість генів-репортерів для аналізу трансгенного протеома, оскільки функція гена-репортера є тільки непрямим індикатором функції трансгена, тобто, зміни експресії одного трансгена у відповідь на присутність додаткового трансгена можуть виявитися не виявленими.

На відміну від способів, описаних вище, для ідентифікації продуктів експресії трансгенів в трансгенній рослині можна використати імунохімію. Хоча імунохімія корисна в цих цілях, даний спосіб вимагає високого ступеня очищення білкових зразків для вироблення антитіл. Отримані в результаті антитіла повинні бути протестовані на специфічність, і для цього необхідно створити

умови аналізу, специфічні відносно реагентів. Обмеженнями корисності цього способу є високий рівень експресії і очищення, необхідний для проведення імунохімічного аналізу, а також пов'язані з цим проблеми видалення забруднень з рослинної тканини.

Для аналізу протеома трансгенної рослини також можна використати мас-спектрометрію. Однак визнані в даній галузі техніки спектрометричні методики вимагають, щоб складні суміші рослинних білків, передусім, були розділені двовимірним гелем-електрофорезом. Rajagopal and Ahern (2001) *Science* 294(5551):2571-73. Див. також Domon and Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17, 214. Одиначні смуги з розділеного в гелі зразка білка згодом можна розщеплювати протеазою і піддавати мас-спектрометрії для ідентифікації унікального білка, спочатку представленого в нерозщепленій смугі. Див., наприклад, Chang et al. (2000) *Plant Physiol.* 122(2):295-317. Стадія розділення в гелі при використанні цього способу є тривалим процесом, який утруднює застосування мас-спектрометрії у високопродуктивних додатках.

У даній галузі техніки існує потреба у високопродуктивному способі виявлення і кількісного визначення продуктів експресії трансгенів в рослинах, який не вимагав би очищеного або високоекспресованого білка, а також використання специфічних відносно методики реактивів. Такий спосіб буде корисною підмогою для рослинників, що займаються трансгенними рослинами, в збереженні сорту цільової трансгенної рослини серед послідовних поколінь при статевому або безстатевому розмноженні. Такий спосіб також буде корисний для швидкого аналізу рослин, отриманих в результаті процедури трансформації, з метою ідентифікації таких отриманих рослин, які є трансгенними рослинами, які експресують вбудований білок в потрібних тканинах. Далі, такий спосіб можна застосовувати для швидкого скринінгу рослин, схильних до ризику контамінації трансгенами з трансгенної рослини, для досягнення біологічної ізоляції трансгенної рослини.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Специфічний варіант здійснення винаходу включає високопродуктивний спосіб виявлення і кількісної оцінки присутності двох або більше представляючих інтерес білків з відомими амінокислотними послідовностями в зразку рослинного походження. Спосіб включає забезпечення першого уприскування змішаного зразка рослинного походження, що містить білки, і розщеплення білків із змішаного зразка рослинного походження на пептиди. У альтернативному варіанті спосіб включає попередню стадію розщеплення білків із змішаного зразка рослинного походження на пептиди з подальшим першим уприскуванням пептидів. Потім пептиди розділяють і іонізують. Для пептидів отримують синхронні мас-спектральні дані і визначають присутність або відсутність двох або більше представляючих інтерес білків.

Ще один варіант здійснення винаходу включає високопродуктивний спосіб виявлення присутності двох або більше представляючих інтерес білків з відомими амінокислотними послідовностями в зразку рослинного походження. Спосіб включає отримання мас-спектральних даних для двох або більше представляючих інтерес білків і здійснення першого уприскування змішаного зразка рослинного походження, що містить білки.

Білки змішаного зразка рослинного походження розщеплюють на пептиди, а потім ці пептиди розділяють і іонізують. Для пептидів отримують синхронні мас-спектральні дані. Синхронні мас-спектральні дані порівнюють з мас-спектральними даними, отриманими для двох або більше представляючих інтерес білків, тим самим, визначаючи наявність або відсутність двох або більше представляючих інтерес білків.

Ще один варіант здійснення винаходу включає спосіб збереження генотипу асортименту трансгенних рослин. Спосіб включає: (i) отримання мас-спектральних даних для одного або більше очікуваних продуктів трансгенної експресії серед трансгенних рослин, (ii) проведення першого уприскування змішаного зразка, що містить білки, з першого покоління асортименту трансгенних рослин, (iii) розщеплення білків із змішаного зразка рослинного походження на пептиди, (iv) розділення пептидів, (v) іонізацію пептидів, (vi) отримання синхронних мас-спектральних даних для пептидів і порівняння синхронних мас-спектральних даних з мас-спектральними даними, наданими для очікуваних продуктів трансгенної експресії, тим самим, визначаючи наявність або відсутність очікуваних продуктів трансгенної експресії в першому поколінні асортименту трансгенних рослин, (vii) проведення першого уприскування змішаного зразка, що містить білки, з другого покоління асортименту трансгенних рослин, (viii) повторення стадій (iii)-(vi) зі змішаним зразком, що містить білки, з другого покоління асортименту трансгенних рослин, і (ix) відмова від розмноження другого покоління асортименту трансгенних рослин в тому випадку, якщо наявність очікуваного продукту (продуктів) трансгенної експресії не була підтверджена за мас-спектральними даними для пептидів із змішаного білкового зразка другого покоління асортименту трансгенних рослин, тим самим, зберігаючи генотип асортименту трансгенних рослин.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фіг. 1 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення AAD-1.

Фіг. 2 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення AAD-12.

Фіг. 3 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry1F.

5 Фіг. 4 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry34.

Фіг. 5 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry35.

Фіг. 6 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення ФАТ.

Фіг. 7 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry1F, експресованого в тканині інбредної кукурудзи.

10 Фіг. 8 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry34, експресованого в тканині інбредної кукурудзи.

Фіг. 9 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення Cry35, експресованого в тканині інбредної кукурудзи.

15 Фіг. 10 показує RX\MC\MC мультиплексне виявлення ФАТ, експресованого в тканині інбредної кукурудзи.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Специфічність, властива мас-спектрометричному підходу при ідентифікації одиничного білка в змішаному зразку, унікальна в тому, що для ідентифікації представляючого інтерес білка потрібна тільки послідовність представляючого інтерес білка. У порівнянні з іншими форматами мультиплексування мас-спектрометрія унікальна, будучи здатною використовувати всю довжину первинної амінокислотної послідовності білка, щоб націлитися на унікальні ідентифікуючі ділянки первинної амінокислотної послідовності і, практично, виключити неспецифічне виявлення. У деяких варіантах здійснення даного винаходу протеолітичний фрагмент або набір протеолітичних фрагментів, який унікальним чином ідентифікує представляючий інтерес білок (білки), застосовують для виявлення представляючого інтерес білка (білків) в змішаному білковому зразку.

У загальних рисах, специфічні способи, запропоновані винаходом, дозволяють здійснити прямий моніторинг і кількісне визначення будь-якого білка (білків) з представляючої інтерес тканини, для чого потрібне тільки попереднє знання амінокислотної послідовності білка (білків). 30 Спосіб може бути реалізований високопродуктивним чином без необхідності розробляти/тестувати реактив, специфічний відносно реакції. Наявність очищеного білка як реактиву для розробки способу незмінно приносить успіх, хоча для розробки способу цього аналізу цілком досить мати білок, ступінь очищення якого становить, наприклад, 60%. Способи, описані в представленому розкритті винаходу, можуть виключити для компетентного фахівця необхідність розробляти вимагаючі напруження сил способи приготування високоочищених зразків білка з метою їх застосування для вироблення антитіл. Таким чином, способи, 35 запропоновані даним винаходом, допоможуть зекономити час і ресурси. Крім того, ці способи забезпечують більшу різноманітність білкових реактивів, придатних для мультиплексного аналізу, оскільки зусилля для видалення, наприклад, останніх 30-40% забруднень можуть стати непотрібними. Розкриті в цьому документі способи також представляють необхідне поліпшення в порівнянні з мультиплексними підходами, основаними на ампліфікації ДНК, які вимагають емпіричного тестування геноспецифічних праймерів, дотримання умов термоцикування і, крім того, створюють ситуації, в яких будь-яка втрата цільової специфічності може значно знизити точність способу внаслідок експонентної ампліфікації, необхідної для виявлення ДНК.

45 У окремих варіантах здійснення способи, що пропонуються даним винаходом, дозволяють здійснити зворотну інженерію білка, щоб визначити, чому специфічний білок має унікальні властивості, причому реальний білок для початку дослідження не потрібний. Наприклад, модифікації послідовності і/або посттрансляційні модифікації цільових білків, які асоційовані з бажаними або небажаними ознаками рослини, можуть бути ідентифіковані за мас-спектральним даними змішаного білкового зразка з рослини, що експресує бажану або небажану ознаку.

50 У деяких варіантах здійснення винаходу розкриті в цьому документі способи дозволяють провести кількісне визначення або оцінку співвідношення різних білків в змішаному білковому зразку за допомогою одноразового мас-спектрометричного аналізу на протигагу індивідуальному багаторазовому вимірюванню кожного представляючого інтерес білка і компіляції індивідуальних результатів в загальний результат для одного зразка.

55 У інших варіантах здійснення даний винахід також пропонує способи, корисні для розвитку і використання технології трансгенних рослин. Більш конкретно, розкриті в цьому документі способи можуть бути використані для збереження генотипів трансгенних рослин серед поколінь. Крім того, деякі варіанти здійснення розкритих в цьому документі способів можуть бути використані для забезпечення високопродуктивного аналізу нетрансгенних рослин, які схильні

до ризику контамінації трансгенами від сусідніх рослин, наприклад, за допомогою перехресного запилення. Завдяки цим варіантам здійснення винаходу може бути полегшено і/або досягнуто біологічне запобігання поширенню трансгенів. У інших варіантах здійснення розкриті в цьому документі способи можуть бути використані для скринінгу результатів процедури трансформації рослин високопродуктивним чином з метою ідентифікації трансформантів, які виявляють бажані властивості експресії.

I. Скорочення

Даний винахід буде описаний з вживанням наступних скорочень:

AAD-1: (R)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат діоксигеназа

AAD-12: (S)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат/альфа-кетоглутарат діоксигеназа

IЗД: Індукована зіткненнями дисоціація

Cry1F: Пестицидний кристалічний білок Cry1Fa (інсектицидний дельта-ендотоксин Cry1F(a))

Cry34: Кристалічний білок ET79 (*Bacillus thuringiensis*)

Cry35: Cry35Ab-подібний (*Bacillus thuringiensis*)

KE: Капілярний електрофорез

ДНК: Дезоксирибонуклеїнова кислота

ELISA: Ферментний імуносорбентний аналіз

ПІП: Посилений іон-продукт

ГМ: Генетично модифікований

ЗЗІ: Захоплення, що залежить від інформації

РХМСМС: Рідинна хроматографія - тандемна мас-спектрометрія

MMP: Моніторинг множинних реакцій

МС: Мас-спектрометрія

МСМС: Тандемна мас-спектрометрія

ФАТ: Фосфінотрицин N-ацетилтрансфераза (PPT N-ацетилтрансфераза)

ПЛР: Полімеразна ланцюгова реакція

ОТ-ПЛР: Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскриптазою

II. Терміни

Для того, щоб полегшити перегляд різних варіантів здійснення винаходу, описаних в цьому документі, дається наступне роз'яснення специфічних термінів:

Біологічна заборона: При використанні в цьому документі термін "біологічна заборона" стосується обмеження переміщення генетично модифікованих рослин або їх генетичного матеріалу в небажані ареали. Цей термін включає фізичну, фізико-хімічну, біологічну заборону, а також інші форми заборони, які запобігають виживанню, поширенню або репродукції генетично модифікованих рослин в природне навколишнє середовище або в штучні умови вирощування.

Змішаний білковий зразок: При використанні в цьому документі термін "змішаний білковий зразок" вживається для диференціації з очищеним білковим зразком. Складний білковий зразок містить множинні білки і додатково може містити інші забруднення.

Мас-спектрометрія: При використанні в цьому документі загальний термін "мас-спектрометрія" стосується будь-якого прийнятного способу, пристрою або конфігурації мас-спектрометрії, включаючи, наприклад, іонізацію електророзпиленням (ІЕР), МС з іонізацією способом лазерної десорбції в присутності матриці (ІЛДПМ), часопротіну МС з ІЛДПМ, МС з ІЛДПМ при атмосферному тиску, МС з ІЛДПМ у вакуумі, тандемну МС або будь-яку комбінацію цих способів. Пристрої для мас-спектрометрії вимірюють молекулярну масу молекули (як функцію співвідношення між масою і зарядом молекули), визначаючи траєкторію польоту молекули через множину магнітних і електричних полів. Співвідношення між масою і зарядом є фізичною величиною, що широко використовується в електродинаміці заряджених частинок. Співвідношення між масою і зарядом певного пептиду апіорно може розрахувати компетентний фахівець в даній галузі. Дві частинки з різним співвідношенням між масою і зарядом, піддаючись впливу однакових електричних і магнітних полів, не будуть рухатися у вакуумі по одній і тій же траєкторії. Даний винахід включає, серед всього іншого, застосування рідинної хроматографії високого дозволу (РХВР) з подальшим аналізом пептидів способом тандемної МС.

Інструменти для мас-спектрометрії складаються з трьох модулів: Джерела іонів, яке розбиває молекули зразка на іони, мас-аналізатора, який сортує іони по їх масі, прикладаючи електромагнітні поля, і детектора, який вимірює величину індикаторної кількості і, тим самим, постачає дані для розрахунку відносного вмісту кожного представленого іона. Така методика має як якісні, так і кількісні варіанти застосування. До їх числа належать ідентифікація невідомих сполук, визначення ізотопного складу елементів в молекулі, визначення структури

сполуки за допомогою спостереження його фрагментації і кількісне визначення сполуки в зразку.

Докладний оглядовий аналіз методологій і пристроїв мас-спектрометрії можна знайти в наступних джерелах, які включені в той документ шляхом посилання: Carr and Annan (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Y: Current Protocols in Molecular Biology*, під редакцією Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.21.1-10.21.27; Paterson and Aebersold (1995) Electrophoresis 16: 1791-1814; Patterson (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. *Y: Current Protocols in Molecular Biology*, під редакцією Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24; and Domon and Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17.

Мультиплексний: Застосовно до терміну, що вживається в цьому документі, білки і/або пептиди "мультиплексовані", коли в одному і тому ж зразку представлені два або більше представляючих інтерес білка і/або пептиди.

Ознака рослини: При використанні в цьому документі термін "ознака рослини" може стосуватися до будь-якої одиничної якісної або кількісної ознаки рослини.

Пептид: Пептиди являють собою короткі полімери, що утворюються в результаті з'єднання одна з одною α -амінокислот в певному порядку. Пептиди також можна отримати в результаті розщеплення поліпептидів, наприклад, білків, протеазою.

Білок: Білки являють собою органічні сполуки амінокислот, вистроєних лінійним ланцюжком і з'єднаних одна з одною пептидними зв'язками між карбоксильними групами і аміногрупами залишків суміжних амінокислот. Послідовність амінокислот в білку визначається послідовністю гена, яка закодована в генетичному коді. Загалом, генетичний код точно визначає 20 стандартних амінокислот, однак в деяких організмах генетичний код може включати селеноцистеїн, а в деяких археях піролізин. Амінокислотні залишки в білку часто бувають хімічно модифіковані за допомогою посттрансляційної модифікації, яка може відбуватися або до використання білка в клітині, або як складова частина механізмів керування. Амінокислотні залишки в білку також можна модифікувати навмисно, застосовуючи методики, відомі компетентному фахівцеві. При використанні в цьому документі термін "білок" охоплює лінійні ланцюжки, що містять природні амінокислоти, синтетичні амінокислоти, модифіковані амінокислоти або комбінації будь-яких перерахованих типів амінокислот.

Одноразове уприскування: При використанні в цьому документі термін "одноразове уприскування" стосується початкової стадії операції в пристрої для МС або РХ-МС. Коли білковий зразок вводять в пристрій одним уприскуванням, весь зразок вводиться в один прийом.

Стопковий/стекінг: При використанні в цьому документі термін "стопковий" стосується наявності множинних гетерологічних полінуклеотидів, вбудованих в геном рослини.

Тандемна мас-спектрометрія: При тандемній мас-спектрометрії батьківський іон, отриманий з представляючої інтерес молекули, може бути відфільтрованим в інструменті для МС, а потім фрагментованим з виходом одного або більше дочірніх іонів, які аналізують (виявляють і/або кількісно визначають) у другій процедурі МС.

Трансгенна рослина: При використанні в цьому документі термін "трансгенна рослина" включає посилання на рослину, яка містить в своєму геномі гетерологічний полінуклеотид. Звичайно гетерологічний полінуклеотид стабільно інтегрований в геном, тобто, цей полінуклеотид передається в подальші покоління потомства. Гетерологічний полінуклеотид може бути інтегрований в геном самостійно або як частина рекомбінантної експресуючої касети. Термін "трансгенний" при вживанні в цьому документі включає будь-яку клітину, клітинну лінію, каліус, тканину, частину рослини або цілу рослину, генотип яких був змінений присутністю гетерологічної нуклеїнової кислоти, включаючи як рослини з початково зміненим генотипом, так і рослини, отримані при перехресному запиленні або безстатевому розмноженні з вихідної трансгенної рослини.

III. Вибір трансгенного білка для мультиплексного аналізу

Способами, що пропонуються даним винаходом, можна проаналізувати будь-який білок, введений в рослину за допомогою технології трансгенної експресії. Білки, придатні для мультиплексного аналізу, відповідно до винаходу можуть надавати трансгенній рослині такої фенотипічної ознаки, яка робить її більш довершеною в порівнянні з нетрансгенним аналогом. Необмежувальними прикладами бажаних ознак, які можуть бути надані трансгенним рослинам, є стійкість до гербіцидів, стійкість до стресу, пов'язаного з впливом навколишнього середовища, підвищена врожайність, поліпшена харчова цінність, поліпшений термін зберігання, змінений вміст олії, змінений склад олії, змінений вміст цукру, змінений вміст крохмалю, вироблення рослинного фармацевтичного засобу, вироблення продуктів промислового призначення (наприклад, полігідроксил-алканолів: макромолекулярних поліефірів, що вважаються

ідеальними для заміщення пластиків, отриманих з нафти) і потенціал для біоремедіації. Крім того, із застосуванням способів, описаних в цьому розкритті винаходу, може бути проаналізована експресія одного або більше трансгенних білків в одному рослинному виді. Додавання двох і більше генів або бажаних ознак в один представляючий інтерес біологічний вид або їх модуляція відомі як стекінг генів (ефект утворення стопи). Крім того, експресія одного або більше трансгенних білків може бути одночасно проаналізована на основі розкритого в цьому документі мультиплексного аналізу з одним або більше ендегенних білків рослини.

Переважа конкретним білкам, вибраним для аналізу, визначається на розсуд фахівця. Такими білками можуть бути, але, не обмежуючись ними, білки рослин, тварин, дріжджів і т. п., крім того, це можуть бути білки, що не виявляються в нетрансформованій клітині або що виявляються в трансформованій клітині. Особливо зручними білками, які експресуються в трансгенних рослинах, є такі білки, які надають цим рослинам стійкості до гербіцидів, комах або вірусів, а також гени, які забезпечують підвищену харчову цінність, вищу врожайність, посухостійкість, утилізацію азоту, вироблення корисних в промисловому відношенні сполук, кращі характеристики переробки рослини або потенціал для біоремедіації. Приклади корисних білків включають білки, що кодується інсектицидним геном *Bacillus thuringiensis*, які надають стійкості до комах, а також генів 5'-енолпірувіл-3'-фосфошкімат-синтази (EPSPS) і його будь-які варіанти, що надають стійкості до гліфосатних гербіцидів. Як буде легко зрозуміло компетентному фахівцеві, будь-який білок, що надає рослині бажаної ознаки, може експресуватися в рослинній клітині із застосуванням технології рекомбінантних ДНК.

IV. Відбір пептидних фрагментів

Відповідно до представленого розкриття винаходу цільові білки можна ідентифікувати, визначаючи наявність протеолітичних пептидних фрагментів цільових білків в спектрах МС із складної суміші рослинних білків. Протеазні ферменти розщеплюють білки в специфічних амінокислотних послідовностях, які можуть бути легко визначені в межах всієї послідовності цільового білка. Отже, набір пептидних фрагментів, отриманих при розщепленні однієї або більше протеаз, можна логічно вивести априорно. Потім, виходячи з первинної амінокислотної послідовності пептиду, можна визначити логічно виведене унікальне співвідношення між його масою і зарядом.

Пептидні фрагменти також можна визначити емпірично по спектрах МС розщеплених цільових білків. Специфічний варіант здійснення винаходу може бути пов'язаний з відбором пептиду, послідовність якого є внутрішньою відносно передбаченим сайтам протеолітичного розщеплення. Для емпіричного відбору пептидних фрагментів з метою ідентифікації цільового білка зразки розщепленого білка можна піддати мас-спектрометрії, щоб визначити пептидні фрагменти, які забезпечують необхідну чутливість і специфічність виявлення для мультиплексної ідентифікації білка. Звичайно переважними для відбору є найрясніші іонізовані пептиди. Рясний вміст специфічного іонізованого пептиду є функцією маси пептиду і ефективності іонізації пептиду.

Представляючи інтерес білки в стопковому продукті будуть експресуватися на різному рівні по відношенню один до одного. Виявлені пептиди будуть отримані з індивідуальних білків, експресованих в різних і іноді невідомих концентраціях. Виявлення пептидів і білків буде варіюватися в діапазоні від атомоларних до мікромолярних концентрацій. Чистота тестованих зразків буде варіюватися від очищених стандартних білків в буферних розчинах до неочищеного матрикса рослини, екстрагованої з різних представляючих інтерес тканин. Якщо цільове виявлення вимагатиме зменшення складності зразка матриксу перед виявленням, то пептидні фрагменти будуть ідентифіковані в неочищеному матриксі рослини так само, як і частково очищений зразок матриксу тканини.

V. Цілеспрямований аналіз ММР

При ідентифікації одного або більше пептидних фрагментів цільового білка, що підлягають визначенню в мультиплексному аналізі, розробляють цілеспрямований аналіз ММР для цільового білка. Переважно, щоб цілеспрямований аналіз ММР для даного цільового білка міг ідентифікувати ті попередньо вибрані пептиди, які являють собою найбільш рясні іонні фрагменти. Таким чином, кожний цільовий пептид, що підлягає визначенню в мультиплексному аналізі, може мати специфічний аналіз ММР, який розроблений для ідентифікації унікальних іонних фрагментів цього цільового пептиду. Мультиплексний аналіз здійснюється через одночасний аналіз ММР, який включає унікальні фрагменти пептиду по типу ідентифікаторів, специфічні для двох або більше цільових білків в зразку рослинної тканини. Переважно, щоб мультиплексний аналіз міг одночасно ідентифікувати ті специфічні пептиди цільового білка, які демонструють ефективну іонізацію і фрагментацію при аналізі, як в присутності, так за

відсутності складного матрикса. Цільовий білок, включений в мультиплексний аналіз, може бути ідентифікований з однією або більше специфічних батьківських/дочірніх пар іонного переходу.

Потім можна провести одноразовий мультиплексний аналіз МС/МС для множинних цільових білків в складній білковій суміші. Завдяки чутливості і специфічності мас-спектрометрії, складний білковий зразок, що підлягає мультиплексному аналізу МС/МС, не повинен бути так же чистим або рясним, як зразок, що аналізується із застосуванням традиційних методик, таких як імунохімія або ПЛР. Однак складний білковий зразок, що підлягає мультиплексному аналізу МС/МС, можна приготувати відповідно до умов екстракції, оптимізованих для робастного аналітичного виконання мультиплексного способу. Білкові зразки можна приготувати відповідно до таких методик, як, серед всього іншого, сольова екстракція (наприклад, бікарбонатом амонію), сольова екстракція в присутності сечовини і екстракція детергентом (наприклад, CHAPS) або інші методики по типу збагачення.

Рослинний матеріал, з якого можна приготувати мультиплексований білковий зразок, вибирається на розсуд компетентного фахівця. Прийнятний матеріал може включати, наприклад, тканину або клітини трансгенної рослини, тканину рослини або клітини, отримані в результаті процедури генетичної трансформації, тканина або клітини нетрансгенних рослин, що аналізується на присутність контамінуючого трансгена, або рослинні матеріали, підозрілі на трансгенне походження рослини.

Мультиплексний аналіз МС проводять на складному білковому зразку. Складний білковий зразок впорскують в іонізаційну камеру для МС, в якій виробляється перший (батьківський) іон. Батьківський іон може бути виявлений прямим чином в першій МС або він може бути виділений за допомогою першої МС, фрагментований на характерні дочірні іони, а один або більше дочірніх іонів можуть бути виявлені у другій МС (МС/МС).

Іони можна виявляти із застосуванням декількох режимів виявлення. Наприклад, відібрані іони можна виявити, застосовуючи режим селективного моніторингу іонів (СМІ), який включає моніторинг множинних реакцій (ММР) або моніторинг вибраної реакції (МІР). У альтернативному варіанті іони можна виявляти, застосовуючи режим сканування.

Співвідношення між масою і зарядом можна визначити, застосовуючи квадрупольний мас-аналізатор. Наприклад, в такому інструменті як "квадруполь" або "квадрупольна іонна пастка" іони в осцилюючому радіочастотному полі випробовують силовий вплив, пропорційний потенціалу DC (постійного струму) між електродами, амплітуді RF (радіочастотного) сигналу і m/z (відношення маси до заряду). Напруження і амплітуду можна підібрати таким чином, щоб тільки іони, що мають особливе співвідношення m/z , проходили всю довжину квадруполя, а всі інші іони відхилялися від прямого напрямку. Таким чином, інструменти квадруполя можуть діяти як "мас-фільтр" і "мас-детектор" для іонів, вприснутих в інструмент.

Індуковану зіткненнями дисоціацію ("ІСД") часто застосовують, щоб генерувати дочірні іони для подальшого виявлення. При ІСД батьківські іони отримують енергію через зіткнення з інертним газом, таким як аргон, і згодом фрагментуються в ході процесу, відомого як "мономолекулярний розпад". У батьківському іоні повинна бути накопичена достатня енергія для того, щоб певні зв'язки всередині іона могли розірватися внаслідок накопиченої вібраційної енергії.

При виконанні МС/МС батьківські іони відбирають в першому аналізі МС. Потім ці відібрані батьківські іони переправляють в камеру для зіткнень, щоб генерувати специфічні дочірні іони пептиду для ідентифікації і кількісного визначення. При певних умовах іонізації/фрагментації батьківські і дочірні іони виробляються відтворювані чином, що надає методиці МС/МС виключно потужних аналітичних можливостей.

У типовому випадку мас-спектрометр забезпечує користувача скануванням іонів, тобто, відносною поширеністю кожного співвідношення m/z в даному діапазоні (наприклад, від 10 до 1200 атомних одиниць маси). Результати дослідження аналізованої речовини, тобто, мас-спектр, можуть бути пов'язані з кількістю аналізованої речовини у вихідному зразку багатьма способами, відомими в даній галузі техніки. Наприклад, при тій умові, що параметри відбору зразків і аналізу ретельно контролюються, відносну поширеність даного іона можна порівняти з таблицею, яка перетворює цю відносну поширеність в абсолютну кількість вихідної молекули. У альтернативному варіанті може бути здійснений прогін із зразками молекулярних стандартів (наприклад, внутрішніх стандартів і зовнішніх стандартів), і в результаті отримана стандартна крива, основана на іонах, генерованих з цих стандартів. При використанні такої стандартної кривої відносну поширеність даного іона можна перетворити в абсолютну кількість вихідної молекули. Середньому фахівцеві в даній галузі техніки повинні бути добре відомі багато інших способів, що дозволяють співвіднести певну кількість іона з певною кількістю вихідної молекули.

Вибір способу іонізації можна визначити на основі підлягаючої вимірюванню речовини, що аналізується, типу зразка, типу детектора, вибору позитивного або негативного режиму і т. д. Іони можна виробляти із застосуванням множини способів, включаючи, але, не обмежуючись ними, електронну іонізацію, хімічну іонізацію, швидке бомбардування атомів, десорбцію електричним полем, іонізацію способом лазерної десорбції в присутності матриці (ІЛДПМ), іонізацію способом лазерної десорбції з посиленням поверхнею (ІЛДПП), іонізацію способом електророзпилення з десорбцією (ІЕРД), фотонну іонізацію, іонізацію способом електророзпилення і індуктивно пов'язану плазму. Іонізація способом електророзпилення стосується способів, в яких розчин пропускають через коротку капілярну трубку з прикладеним до її кінця високим позитивним або негативним електричним потенціалом. Розчин, що досягає кінця трубки, розпилюється (небулізується), перетворюючись в струмінь або аерозоль з дуже дрібних крапельок розчину в парах розчинника. Цей аерозольний серпанок крапельок протікає через випарну камеру, яку нагрівають для попередження конденсації і для повного випаровування розчинника. У міру того як крапельки стають менші, густина поверхневого електричного заряду збільшується аж до того моменту, коли в результаті природного відштовхування між однаковими зарядами почнуть вивільнятися іони, а також нейтральні молекули.

Витікаючий потік РХ можна напряму і автоматично (тобто, "лінійно") вприснути в електророзпилювальний пристрій. У деяких варіантах здійснення винаходу білки, що містяться у витікаючому потоці РХ, передусім, іонізуються електророзпиленням, перетворюючись в батьківський іон. Перший квадруполь МСМС настроєний як мас-фільтр для батьківських іонів мультиплексованих цільових білків.

Батьківські іони, що проходять через перший квадруполь, потім іонізуються і/або фрагментуються перед потраплянням у другий квадруполь. У деяких варіантах здійснення винаходу іони стикаються з молекулами інертного газу в процесі індукованої зіткненнями дисоціації (ІСД). Прийнятні інертні гази включають, наприклад, аргон, гелій, азот і т. д. Бажано, щоб батьківські іони мультиплексованих цільових білків були фрагментовані на дочірні іони, які і підлягають подальшому виявленню.

VI. Зберігання сорту трансгенної рослини

Способи, представлені в даному розкритті винаходу, можна використати для зберігання сортового генотипу трансгенної рослини. Складні білкові зразки, приготовані з наступного покоління нащадків трансгенної рослини можна піддати мультиплексному аналізу МСМС, щоб визначити присутність або відсутність представляючого інтерес білка. Складні білкові зразки можуть містити трансгенні білки, експресовані в трансгенному рослині. Розмножити ті рослини, а яких було підтверджено наявність представляючого інтерес трансгенного білка, можна гарантовано забезпечити експресію представляючого інтерес трансгенного білка в подальших поколіннях. Подібним чином, можна відмовитися від розмноження в наступному поколінні тих рослин, в яких не була підтверджена наявність представляючого інтерес трансгенного білка.

VII. Результати скринінгу процедури трансформації рослини

Способи, представлені в даному розкритті винаходу, також можна використати для швидкого скринінгу результатів процедури трансформації рослини, здійснюваного високопродуктивним чином. Внаслідок варіабельності генотипу і характеристик експресії ГМ рослин і рослинних клітин, отриманих в результаті рекомбінації ДНК, рослини і рослинні клітини, отримані в процедурі трансформації рослини, не обов'язково будуть мати аналогічний або схожий профіль експресії введених трансгенних білків, наприклад, гетерологічних білків. Крім того, ендегенні білки можуть виявляти в різній мірі змінений профіль експресії. У деяких варіантах здійснення даного винаходу складні білкові зразки, можуть бути приготовані з рослин, рослинних тканин або рослинних клітин, отриманих в процедурі трансформації рослини. Потім приготовані складні білкові зразки можна піддати мультиплексному аналізу МС/МС. Потім спектри МС різних зразків аналізують для ідентифікації тих зразків, які демонструють бажані характеристики експресії. Потім вихідну рослину, рослинну тканину або рослинні клітини ідентифікованих зразків можна розмножити для відбору бажаних характеристик експресії.

VIII. Досягнення біологічної заборони трансгенів

Трансгени можуть виходити з трансгенної рослини в навколишнє середовище і інтегруватися в геном навколишніх рослин, наприклад, за допомогою перехресного запилення. У більшості випадків це небажано. У деяких варіантах здійснення способи, представлені в цьому розкритті винаходу, застосовуються для того, щоб досягнути біологічного утримання трансгенів в трансгенній рослині. У цих і подальших варіантах здійснення винаходу складні білкові зразки можуть бути приготовані з рослини (рослин), рослинної тканини (тканин) або рослинних клітин, які схильні до ризику контамінації генетичним матеріалом з трансгенної

рослини. Потім приготовані складні білкові зразки можна піддати мультиплексному аналізу МС/МС. Після цього спектри МС різних зразків аналізують, щоб визначити рослини, що містять цільовий трансгенний білок, наприклад, трансгенний білок, що експресується в трансгенній рослині. Присутність цільового білка в зразку зв'язують з проникненням трансгена в аналізовану

рослину (рослини), рослинну тканину (тканини) або рослинні клітини. Біологічної заборони трансгенів можна досягнути, ліквідуючи, стримуючи або іншим чином обмежуючи ріст і розмноження контамінованої рослини (рослин), рослинної тканини (тканин) або рослинних клітин.

У доповнення до описаних в цьому документі специфічних прикладів можливі варіанти здійснення винаходу піддаються різним модифікаціям і допускають альтернативні форми. Таким чином, варіанти здійснення винаходу не обмежуються розкритими конкретними формами. Швидше можна говорити про те, що сфера винаходу охоплює всі модифікації, еквіваленти і альтернативи, викладені в прикладеній формулі винаходу.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД I

Для розробки мультиплексного аналізу РХ\МС\МС були відібрані шість окремих трансгенних білків (Cry1F, Cry34, Cry35, AAD-1, AAD-12 і ФАТ). Індивідуальні білки були виявлені і ідентифіковані за допомогою мас-спектроскопії в одноразовому уприскуванні складної білкової суміші.

Перший варіант мультиплексного аналізу був проведений за допомогою протеолітичного розщеплення шести білків окремо з подальшим збільшенням концентрації отриманих білкових пептидів в протеолітично розщеплених екстрактах рослинної тканини і застосуванням РХ\МС\МС для виявлення специфічних попередників/іонних фрагментів для кожного з шести білків в одноразовому уприскуванні. Методика, розроблена для цього першого варіанту мультиплексного аналізу, згодом була застосована для мультиплексного виявлення чотирьох білків, експресованих в сучасному селекційному матеріалі інбредної кукурудзи.

ПРИКЛАД II

Мультиплексне виявлення РХ\МС\МС у рослини

У таблиці 1 перераховані отримані концентрації кожного окремого вихідного білка і результуюча розбавлення кожного білка при розщепленні трипсином. Перед розщепленням протеазою (трипсином) всі білки були забуферені 25 mM бікарбонату амонію, pH 7,9 (SIGMA) для забезпечення ефективних умов розщеплення. Аліквотну пробу кожного вихідного білка (див. таблицю 1) переносили в стерильну пробірку Епендорфа ємністю 1,5 мл і доводили до об'єму 100 мкл із застосуванням 25 mM бікарбонату амонію, pH 7,9. Для заміни буфера кожного білка були використані опріснюючі спіні-колонки Zeba (Pierce # 89882) відповідно до рекомендацій виробника. Були проведені три спінові промивання колонки Zeba із застосуванням в кожному випадку 300 мкл 25 mM бікарбонату амонію, pH 7,9 і розкрученням на швидкості 1500 g протягом 1 хвилини. Потім аліквотну пробу 100 мкл кожного білка із зразка наносили на поверхню смоли колонки Zeba і розкручували на швидкості 1500 g протягом 2 хвилин. Потім цей забуферений матеріал прямим чином використали для розщеплення трипсином і отримання пептидних фрагментів білка. Початкове розщеплення шести білків трипсином не включало передбаченого протоколом стадії алкілювання амінокислотних залишків цистеїну. Ця стадія алкілювання може бути включена пізніше, але з метою високопродуктивного аналізу, причому пропускання стадії алкілювання може зберегти час і сили для заключного аналізу. Кожен забуферений зразок білка 100 мкл був внесений в 5 mM DTT з додаванням 1 мкл 0,5 M DTT, потім денатурований нагріванням при температурі 95°C протягом 20 хвилин і охолоджений до кімнатної температури (25°C). Модифікований трипсин ступеня чистоти для секвенування був ресуспендований в 25 mM бікарбонату амонію, pH 7,9, до концентрації 0,4 мг/мкл. Трипсиновий фермент додавали до кожного зразка білка, доводячи кінцеве співвідношення ферменту до субстрату до діапазону від 1:20 до 1:50. Розщеплення трипсином проводили в термоциклері, використовуючи температурний профіль 37°C протягом 16 годин, а потім охолоджували матеріал до 4°C. Після розщеплення трипсином до кожного перевару білка додавали 3 мкл 10% мурашиної кислоти.

Таблиця 1

Концентрації і розбавлення білка для кожного мультиплексного PX\MC\MC аналізу
трипсинового перевару 6 білків

| | | | Трипсиновий перевар | Кінцевий об'єм перевару 100 мкл | [трипсиновий перевар] |
|--------|-------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------------|------------------------------|
| Назва | [запас] мкг/мл | розщеплений об'єм запасу (мл) | кількість розщепленого білка (мкг) | коефіцієнт розбавлення перевару | [білок] перевару (мкг/мл) |
| Cry1F | 160 | 0,01 | 1,6 | 1:10 | 16 |
| Cry34 | 500 | 0,025 | 12,5 | 1:4 | 125 |
| Cry35 | 187 | 0,045 | 8,415 | 1:2,2 | 85,0 |
| AAD-1 | 4200 | 0,005 | 21 | 1:20 | 210 |
| AAD-12 | 1000 | 0,02 | 20 | 1:5 | 200 |
| ФАТ | 300 | 0,033 | 9,9 | 1:3 | 100 |

- 5 Спочатку кожний з шести білкових зразків, розщеплених трипсином, аналізували способом IEP-PX\MC\MC, щоб визначити трипсинові пептидні фрагменти, здатні забезпечити достатню чутливість і специфічність для одночасної мультиплексної ідентифікації всіх шести білків в одному аналізі. Для розробки методики був застосований мас-спектрометр Applied Biosystems MDS Sciex 4000 Q Trap hybrid triple quad, (Foster City, модель СА # 1004229-V), що використовує джерело турбо V IEP, змонтоване з датчиком TSI. Зразки вводили в мас-спектрометр через систему PXBP Agilent 1100. Таблиця 2 включає інформацію про специфічний номер моделі і версію програмного забезпечення для різних інструментальних компонентів.
- 10

Таблиця 2

Інформація про модель/версію програмного забезпечення для інструментальних компонентів

| | |
|---------------------------------|--|
| Мас-спектрометр | 4000 Q TRAP |
| Версія програмного забезпечення | M401402 B4T0301 M3L1412 B3T0300 |
| Назва компонента | Квадрупольний мас-спектрометр PX/MC/MC з лінійною іонною пасткою |
| ID компонента | 4000 Q TRAP |
| Виробник | AB Sciex Instruments |
| Модель | 1004229-V |
| Автоматичний пробовідбірник | Agilent 1100 G1367A |
| Версія програмного забезпечення | A.05.04 |
| Приєднаний насос | G1312A |
| Колонковий термостат | Agilent 1100 G1367A |
| Версія програмного забезпечення | A.05.05 |
| Перемикаючий клапан | Встановлений |
| Насос | Agilent 1100 G1367A |
| Версія програмного забезпечення | A.05.04 |

Хроматографію із оберненою фазою проводили, застосовуючи систему PXBP Agilent 1100, оснащену 4 мкм колонкою Phenomenex Jupiter Proteo 50×2,0 мм з умовою завантаження 95 % А (Н₂О/0,1 % мурашиної кислоти)/5 % В (ацетонітрилу/0,1 % мурашиної кислоти) протягом 1
5 хвилини і з градієнтом до 90 % В протягом 20 хвилин. Колонку регенерували з 2-хвилинною підтримкою на рівні 90 % В, а потім повторно врівноважували до 5 % В протягом 5 хвилин. З метою початкового скринінгу окремих білкових пептидів в колонку для аналізу завантажували приблизно 10-50 фмоль кожного білка.

Для кожного з шести мультиплексованих білків був проведений аналіз способом 33І із
10 ввімкненням двох сканів УІП по двох найрясніших іонах, виявлених зі списку перетворень MMP, специфічних для кожного білка. Ці дані по фрагментуванню були інформативними для вибору іонних фрагментів, що демонструють найвищий вміст в кожному вибраному пептиді. Як правило, для подальшої розробки методики відбирали три вищі іонних фрагмента з виявленого пептиду попередника. Для здійснення цього 33І система Sciex 4000 Q TRAP ввела в дію
15 наступні умови: вольтаж ІS 5500, DP 75, EP 10, CXP 12, CUR 10, CAD HIGH, TEM 450, GS1 35, GS2 35, блок RES Q1 і блок RES Q3. Значення KE для кожного пептиду тестували емпірично з використанням оптимальної величини для кожного пептиду. Використовуючи дані пептидної фрагментації, накопичені в результаті аналізу індивідуальних 33І для кожного з шести білків, потім ми провели аналіз MMP для кожного окремого білка, щоб ідентифікувати в кожному білку
20 іони попередники з хорошою ефективністю іонізації. Для кожного мультиплексного білка був використаний список MMP всіх трипсинових пептидів, щоб створити індивідуальний спосіб аналізу MMP. Використовуючи дані індивідуального аналізу білків способом MMP як критерій ефективності іонізації, ми вибрали для кожного білка пептиди, що служать іонами попередниками в мультиплексному форматі. Мультиплексні пептиди перераховані в таблиці 3.

25

Пептиди, відібрані для початкового 6-мультиплексного способу PX\MC\MC

| |
|--|
| Білок/мультиплексовані пептиди |
| AAD-1((R)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат діоксигеназа) |
| T6 FGPVDPVPLLK |
| T7 SIEGYPEVQMIR |
| T12 VFGSLYQAQNR |
| AAD-12 ((S)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат/альфа-кетоглутарат діоксигеназа) |
| T4 IGGGDIVAINVK |
| T9 AAYDALDEATR |
| T19 AEPWDFK |
| Cry1F (пестицидний кристалічний білок Cry1Fa (інсектицидний дельта-ендотоксин Cry1F(a))) |
| T22 TYPIQTSSQLTR |
| T46 IFAGQFNK |
| Cry34 (кристалічний білок ET79 [Bacillus thuringiensis]) |
| T7 TSPTNVANDQIK |
| Cry35 (Cry35Ab-подібний [Bacillus thuringiensis]) |
| T9 VLTAGTGQALGLIR |
| T17 YQYWQR |
| ФАТ: (Фосфінотрицин N-ацетилтрансфераза (PPT N-ацетилтрансфераза)) |
| T2 TERQTPQEWIDDLER |
| T8 LGLGSTLYTHLLK |
| T10 SVVAVIGLPNDPSVR |

ПРИКЛАД III

Крім того, був розроблений одиночний цільовий мультиплексний аналіз MMP з методикою PX\MC\MC для всіх шести білків DAS з використанням даних про попередника/іонний фрагмент, отриманих в результаті аналізу індивідуальних білків. Ці білки спочатку були мультиплексно виявлені способом PX\MC\MC при підкріпленні буфером бікарбонату амонію (25 mM, pH 7,9) з використанням матеріалу трипсинового перевару для кожного з шести білків.

Приблизно 5-20 фмоль кожного білка впорскували в колонку для початкового 6-мультиплексного аналізу посиленого буфера.

ФІГУРИ 1-6 показують екстраговані іонні хроматограми для кожного з шести білків, виявлених в одноразовому уприскуванні. Більш конкретно, Фіг. 1 показує мультиплексне виявлення AAD-1 способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для AAD-1 ((R)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат діоксигенази), виявленої в одноразовому уприскуванні разом з AAD-12, Cry1F, Cry34, Cry35 і ФАТ в екстракті з насіння кукурудзи.

Фіг. 2 показує мультиплексне виявлення AAD-12 способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для AAD-12 ((S)-2,4-дихлорфеноксіпропіонат/альфа кетоглутарат діоксигенази), виявленої в одноразовому уприскуванні разом з AAD-1, Cry1F, Cry34, Cry35 і ФАТ в екстракті з насіння кукурудзи.

Фіг. 3 показує мультиплексне виявлення Cry1F способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для Cry1F (пестицидного кристалічного білка Cry1Fa (інсектицидного дельта-ендотоксину Cry1F(a))), виявленого в одноразовому уприскуванні разом з AAD-1, AAD-12, Cry34, Cry35 і ФАТ в екстракті з насіння кукурудзи.

Фіг. 4 показує мультиплексне виявлення Cry34 способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для Cry34 (кристалічного білка ET79 [Bacillus thuringiensis]), виявленого в одноразовому уприскуванні разом з AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry35 і ФАТ в екстракті з насіння кукурудзи.

Фіг. 5 показує мультиплексне виявлення Cry35 способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для Cry35 (Cry35Ab-подібного [Bacillus thuringiensis]), виявленого в одноразовому уприскуванні разом з AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34 і ФАТ в екстракті з насіння кукурудзи.

Фіг. 6 показує мультиплексне виявлення ФАТ способом PX\MC\MC. Дані являють собою екстраговану PX\MC\MC іонну хроматограму для Cry35 (фосфінотрицин N-ацетилтрансферази (PPT N-ацетилтрансферази)), виявленої в одноразовому уприскуванні разом з AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34 і Cry35 в екстракті з насіння кукурудзи.

Після підтвердження мультиплексного виявлення всіх шести білків способом PX\MC\MC суміш пептидів з бікарбонатом амонію була введена в розщеплений протеазою екстракт з

тканини насіння кукурудзи для виявлення в міжклітинному матриксі насіння. Використана тканина насіння походила з сучасного інбредного матеріалу. Посилений зразок був розбавлений в співвідношенні 1:10 бікарбонатом амонію, а потім в співвідношенні 1:2 в екстракті з насіння кукурудзи, при цьому приблизно від 0,2 до 1 фмоль кожного білка було вприснуто в колонку і виявлено із застосуванням мультиплексного способу PX\MC\MC.

ПРИКЛАД IV

Чотири окремих трансгенних білки (Cry1, Cry34, Cry35 і ФАТ) були виявлені і ідентифіковані за допомогою мас-спектроскопії в одноразовому уприскуванні складної білкової суміші з інбредних рослинних матеріалів (5ХН751ХТ). Білок був виявлений як в тканині листя, так і в тканині насіння.

Описана вище 6-мультиплексна методика була використана для виявлення присутності чотирьох окремих трансгенних білків (Cry1F, Cry34, Cry35 і ФАТ) в одноразовому уприскуванні складного білкового зразка з рослинного матеріалу інбредної лінії (5ХН751ХТ). У цій спробі був розроблений 4-мультиплексний спосіб з одноразовим уприскуванням для визначення присутності чотирьох білків як в тканині насіння кукурудзи, так і в тканині листя кукурудзи. Експериментальний контроль включав порівняння з пустим екстрактом 5ХН751, збагаченим цільними трансгенними білками перед ферментативним розщепленням і порівняння з ферментативно розщепленим пустим екстрактом 5ХН751.

Для цього експерименту також була продумана методика екстракції, необхідна для робастного аналітичного здійснення мультиплексного способу. Оскільки мультиплексне виявлення одночасно вимірює множинні білки в кожному індивідуальному зразку, застосовуваний спосіб екстракції білків повинен бути ефективним для всіх білків з метою їх точного вимірювання. Як показано на ФІГ. 11, умови екстракції були протестовані на тканині листя і насіння кукурудзи. У першій спробі зрозуміти, як ці чотири різних білки виявлять себе відносно єдиного способу екстракції з урахуванням таких факторів, як стабільність, розчинність і гідрофобність білка, були протестовані три самостійних умови екстракції.

Привабливість простої екстракції білка бікарбонатом амонію полягає в можливості безпосередньо перейти від стадії екстракції до розщеплення протеазою, не турбуючись про супресію сигналу в зв'язку з буферним компонентом при аналізі способом МС. Це може знизити вартість, але, що представляється більш важливим, істотно зменшити витрати часу на підготовку і можливу мінливість, пов'язану із заміною буфера. Для того, щоб визначити, чи потрібен для виявлення всіх чотирьох білків в рослинних тканинах спосіб агресивної солюбілізації, був протестований буфер 8М з сечовиною. Був використаний буфер PBS-T, оскільки він традиційно застосовується для методик виявлення ELISA.

Матеріал 5ХН751ХТ з тканини листя: Тканину листя збирали з вирощеної в теплиці рослини V6-V7 і подрібнювали під рідким азотом. Випробувальна вага кожного зразка листя становила 1,5 г. Кожний екстрагуючий буфер (Фіг. 11) був протестований при співвідношенні між буфером і зразком 2:1 (3 мл). Зразки перемішували вихровим рухом протягом 2 хвилин, потім центрифугували 2 хвилини і збирали супернатанти.

Матеріал 5ХН751ХТ з тканини насіння: Отримували тканину зрілого насіння і подрібнювали її в кульовому млині. Випробувальна вага кожного зразка насіння становила 1,5 г. Кожний екстрагуючий буфер (Фіг. 11) був протестований при співвідношенні між буфером і зразком 2:1 (3 мл). Зразки перемішували вихровим рухом протягом 2 хвилин, потім центрифугували 2 хвилини і збирали супернатанти.

Зразки, екстраговані в 8М сечовині або PBS-T, були забуферені в 25 mM бікарбонаті амонію із застосуванням відцентрових фільтрів Pierce Zeba. Для всіх зразків 50 мкл тканинного екстракту розщеплювали 10 мкг трипсину (видалення) в 110 мкл загальних об'єми бікарбонату амонію. Розщеплення білка проводили при 37°C протягом 16 годин з подальшим охолодженням до 4°C. Як позитивний контроль для кожного з чотирьох білків, що підлягають мультиплексному виявленню, була використана приготована з очищених білкових стандартів суміш типу коктейлю, що містить приблизно 50 мкг/мл кожного індивідуального цільного білка. Кінцеве розведення коктейлю 1:10 було використано як з пустим зразком екстракту листя, так і з пустим зразком екстракту насіння для позитивного контролю матриксу в приблизній концентрації 5 мкг/мл. Ці посилені пусті зразки служили позитивним контролем, дозволяючи точно оцінити час утримання пептидів при РХ і дані фрагментування послідовності по методиці МС/МС при порівнянні з пустим тканинним контролем (негативний контроль) і екстрактами 5ХН751ХТ з тканини кукурудзи. Оскільки всі чотири білки, що підлягають мультиплексному виявленню в матеріалі 5ХН751ХТ, були білками, також використаними для розробки вищеописаного 6-мультиплексного способу РХ/МС/МС, не була потрібна ніяка додаткова розробка для

визначення того, які специфічні пептиди/іонні фрагменти білка треба виявляти і при яких інструментальних умовах.

Вищеописаний 6-мультиплексний спосіб був використаний для аналізу тканинних екстрактів листя і насіння 5ХН751ХТ. ФІГУРИ 7-10 представляють підвибірку даних, отриманих при 4-мультиплексному аналізі одноразового уприскування способом LC-МС/МС для виявлення білків Cry1F, Cry34, Cry35 і ФАТ, що експресуються в тканини листя і насіння інбредної кукурудзи.

Більш конкретно, Фіг. 7 показує мультиплексне виявлення способом РХ-МС/МС білка Cry1F, експресованого в тканині інбредної кукурудзи. Дані являють собою спектри МС/МС, специфічні для білка Cry1F, виявленого мультиплексним аналізом в тканині листя кукурудзи 5ХН751, екстрагованій 25 мМ бікарбонатом амонію. Були виявлені три Т22-специфічних для Cry1F іонних фрагмента, але тут показаний тільки один фрагмент. Також показані позитивний і негативний контроль для транзиції МС/МС.

Фіг. 8 показує мультиплексне виявлення способом РХ-МС/МС білка Cry34, експресованого в тканині інбредної кукурудзи. Дані являють собою спектри МС/МС, специфічні для білка Cry34, виявленого мультиплексним аналізом в тканині листя кукурудзи 5ХН751, екстрагованій 25 мМ бікарбонатом амонію. Також показані позитивний і негативний контроль для транзиції МС/МС. Були виявлені п'ять Т7-специфічних для Cry34 іонних фрагментів, але тут показаний тільки один з них. Легкий зсув за часом утримання між зразком 5ХН751ХТ і посиленням позитивним контролем Cry34 не є несподіваним для білка, елюйованого в ранній, більш гідрофобній області обернено-фазового градієнта. Пік, показаний в контрольній панелі пустого зразка тканини листя не є специфічним піком, про що свідчить великий (~7 хвилин) зсув за часом утримання в колонці. Жоден з інших чотирьох іонних фрагментів Cry34 не мав специфічних піків.

Фіг. 9 показує мультиплексне виявлення способом РХ-МС/МС білка Cry35, експресованого в тканині інбредної кукурудзи. Дані являють собою спектри МС/МС, специфічні для білка Cry35, виявленого мультиплексним аналізом в тканині листя кукурудзи. Також показані позитивний і негативний контроль для транзиції МС/МС. Показані дані для тканини листя кукурудзи 5ХН751, екстрагованої 25 мМ бікарбонатом амонію. Були виявлені три Т9-специфічних для Cry35 іонних фрагмента, але тут показаний тільки один з них.

Фіг. 10 показує мультиплексне виявлення способом РХ/МС/МС білка ФАТ, експресованого в тканині інбредної кукурудзи. Дані являють собою спектри МС/МС, специфічні для білка ФАТ, виявленого мультиплексним аналізом в тканині листя кукурудзи. Також показані позитивний і негативний контроль для транзиції МС/МС.

Для кожного білка був виявлений і фрагментований специфічний пептид попередник з трьома-п'ятьма відповідними іонними фрагментами, виявленими для надійного підтвердження білкової послідовності. Кожна з фігур 7, 8, 9 і 10 демонструє спектри МС/МС, специфічні для одного з чотирьох білків, виявлених мультиплексним аналізом в тканині кукурудзи. Кожна фігура також демонструє специфічний позитивний і негативний контроль для конкретної транзиції МС/МС. Два з чотирьох білків були виявлені в тканині насіння. Нездатність виявити два з чотирьох білків, ймовірно, була пов'язана з низькою експресією, оскільки історично дані демонструють знижену експресію цих чотирьох білків в тканині насіння в порівнянні з тканиною листя.

ПРИКЛАД V

Сорт трансгенної рослини підтримують, підтверджуючи присутність двох представляючих інтерес білків в наступному поколінні цього сорту рослини. Відбір трансгенної рослини оснований на присутності двох представляючих інтерес трансгенних білків (А і В). Готують зразки білків А і В, які піддають аналізу способом РХ/МС/МС. По виявлених спектрах МС проводять відбір пептидних іонних фрагментів батьківських білків для цільового аналізу МС/МС.

З першого покоління трансгенної рослини готують складний білковий зразок для мультиплексного аналізу способом РХ/МС/МС, в якому ідентифікують відібрані пептидні іонні фрагменти білків А і В, визначаючи присутність відібраних пептидних іонних фрагментів в спектрах МС. Потім готують складні білкові зразки з наступного покоління трансгенної рослини. Складні білкові зразки, отримані з цих рослин другого покоління, піддають мультиплексному аналізу способом РХ/МС/МС. Для підтримки сорту трансгенної рослини розмножати ті рослини наступного покоління, з яких були отримані складні білкові зразки, що демонструють такі спектри МС, в яких можна ідентифікувати обидва білки (А і В) по присутності відібраних пептидних іонних фрагментів. Для підтримки сорту трансгенної рослини не розмножати ті рослини наступного покоління, з яких були отримані складні білкові зразки, що демонструють такі спектри МС, в яких не вдалося ідентифікувати обидва білки (А і В).

ПРИКЛАД VI

Трансформанти, отримані в процедурі трансформації рослини, скринують, щоб визначити присутність двох представляючих інтерес цільових білків. Два цільові білки (А і В) піддають аналізу способом РХ/МС/МС. По виявлених спектрах МС проводять відбір пептидних іонних фрагментів цільових батьківських білків для цілеспрямованого аналізу МС/МС.

У процедурі трансформації рослини отримують передбачувані трансформанти. З кожного передбачуваного трансформанта отримують складні білкові зразки. Складні білкові зразки, отримані з цих передбачуваних трансформантів, піддають мультиплексному аналізу способом РХ/МС/МС, в якому визначають експресію цільових білків по присутності відібраних пептидних іонних фрагментів. Ті трансформанти, з яких були отримані складні білкові зразки, що демонструють спектри МС з бажаними характеристиками експресії білків А і В, що визначаються по присутності відібраних пептидних іонних фрагментів, розмножують.

ПРИКЛАД VII

Біологічна заборона трансгенів в трансгенній рослині. Два цільові білки (А і В), що експресуються трансгенною рослиною, піддають аналізу способом РХ/МС/МС. По виявлених спектрах МС проводять відбір пептидних іонних фрагментів цільових батьківських білків для цілеспрямованого аналізу МС/МС.

Збирають рослинний матеріал з рослин, що вирости в навколишньому середовищі по сусідству з трансгенною рослиною. З цього рослинного матеріалу готують складні білкові зразки. Складні білкові зразки, отримані з цього рослинного матеріалу, піддають мультиплексному аналізу способом РХ/МС/МС, в якому визначають експресію контамінуючого трансгена, виявляючи присутність відібраних пептидних іонних фрагментів експресованого трансгенного білка. Ті рослини, з яких був отриманий матеріал, що демонструє за результатами мультиплексного аналізу способом РХ/МС/МС трансгенним білком, знищують.

У цей документ шляхом посилання включені у всій повноті наступні джерела:

Alwine et al. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5350-54; Baldwin (2004) *Mol. Cell. Proteomics* 3(1): Carr and Annan (1997) *Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry*. У: *Current Protocols in Molecular Biology*, під редакцією Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.21.1-10.21.27; Chang et al. (2000) *Plant Physiol.* 122(2):295-317; Domon and Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17; Nain et al. (2005) *Plant Mol. Biol. Rep.* 23:59-65; Patterson (1998) *Protein identification and characterization by mass spectrometry*. У: *Current Protocols in Molecular Biology*, під редакцією Ausubel, et al. New York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24; Paterson and Aebersold (1995) *Electrophoresis* 16: 1791-1814; Rajagopal and Ahern (2001) *Science* 294(5551):2571-73; Sesikeran and Vasanthi (2008) *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl. 1:241-44; and Toplak et al. (2004) *Plant Mol. Biol. Rep.* 22:237-50.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Високопродуктивний спосіб виявлення присутності двох або більше білків, що становлять інтерес, з відомими амінокислотними послідовностями в зразку рослинного походження, де вказаний спосіб включає:

виділення складного білкового зразка із зразка рослинного походження, де вказаний складний білковий зразок містить множинні білки;

розщеплення вказаного складного білкового зразка з отриманням пептидів;

розділення пептидів з використанням рідинної хроматографії - тандемної мас-спектрометрії (РХ/МС/МС);

іонізацію пептидів; отримання одночасних мас-спектральних даних для пептидів; і

порівняння вказаних одночасних мас-спектральних даних з мас-спектральними даними, отриманими для двох або більше білків, що становлять інтерес, за допомогою чого визначається присутність або відсутність двох або більше білків, які становлять інтерес.

2. Спосіб за п. 1, в якому складний білковий зразок розщеплюють в один прийом перед уприскуванням.

3. Спосіб за п. 1, в якому пептиди розділяють в один прийом.

4. Спосіб за п. 1, в якому пептиди іонізують в один прийом.

5. Спосіб за п. 1, в якому одночасні мас-спектральні дані для пептидів, що відповідають двом або більше білкам, що становлять інтерес, отримують в один прийом.

6. Спосіб за п. 1, в якому два або більше білків, що становлять інтерес, є двома білками, що становлять інтерес.

7. Спосіб за п. 1, в якому два або більше білків, що становлять інтерес, є чотирма білками, що становлять інтерес.

8. Спосіб за п. 1, в якому зразок рослинного походження є зразком з трансгенної рослини.

9. Спосіб за п. 1, в якому зразок рослинного походження є зразком з трансгенної рослини, а два або більше білків, що становлять інтерес, є очікуваними продуктами експресії трансгена в трансгенній рослині.

10. Спосіб за п. 1,

5 де вказаний спосіб додатково включає отримання мас-спектральних даних для двох або більше білків, що становлять інтерес;

і де визначення присутності або відсутності двох або більше білків, що становлять інтерес, включає порівняння одночасних мас-спектральних даних для вказаних пептидів з мас-спектральними даними для двох або більше білків, що становлять інтерес.

10 11. Спосіб за п. 10, в якому зразок рослинного походження є зразком з трансгенної рослини.

12. Спосіб за п. 1, де виділення складного білкового зразка із зразка рослинного походження включає виділення складного білкового зразка, що містить множинні білки, з першого покоління сорту трансгенної рослини;

де визначення присутності або відсутності двох або більше білків, що становлять інтерес, включає порівняння одночасних мас-спектральних даних для вказаних пептидів з мас-спектральними даними очікуваних продуктів експресії трансгена, з визначенням присутності або відсутності очікуваних продуктів експресії трансгена в першому поколінні сорту трансгенної рослини; і

де вказаний спосіб додатково включає:

20 визначення присутності або відсутності очікуваних продуктів експресії трансгена у другому поколінні сорту трансгенної рослини; і

відмову від розмноження другого покоління сорту трансгенної рослини, якщо присутність очікуваного продукту (продуктів) експресії трансгена не може бути підтверджена у другому поколінні сорту трансгенної рослини, чим підтримується генотип сорту трансгенної рослини.

25

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow Agrosiences LLC
Lawry, John R
Flook, Joshua A

<120> МУЛЬТИПЛЕКСНИЙ АНАЛІЗ СТОКОВОГО ТРАНСГЕННОГО ВІЛКА

<130> 2971-10111

<150> PCT/US2010/037192
<151> 2010-06-03

<160> 32

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид Т6 для AAD-1

<400> 1

Phe Gly Pro Val Asp Pro Val Pro Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид Т7 для AAD-1

<400> 2

Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид Т12 для AAD-1

<400> 3

Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln Ala Gln Asn Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> Пептид T4 для AAD-12

<400> 4

Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид T9 для AAD-12

<400> 5

Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид T19 для AAD-12

<400> 6

Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys
1 5

<210> 7
<211> 12
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид T22 для Cry1F

<400> 7

Thr Tyr Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Пептид T46 для Cry1F

<400> 8

Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys
1 5

```

<210> 9
 <211> 12
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Т7 для Cry34

<400> 9

Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Т9 для Cry35

<400> 10

Val Leu Thr Ala Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Т17 для Cry35

<400> 11

Tyr Gln Tyr Trp Gln Arg
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Т2 для РАТ

<400> 12

Thr Glu Pro Gln Thr Pro Gln Glu Trp Ile Asp Asp Leu Glu Arg
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 13
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептид Т8 для РАТ

<400> 13

Leu Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Пептид T10 для PAT

<400> 14

Ser Val Val Ala Val Ile Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Іонний фрагмент Y7 для пептиду T6 для AAD-1

<400> 15

Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент Y6 для пептиду T6 для AAD-1

<400> 16

Pro Val Pro Leu Leu Lys
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент Y6 для пептиду T12 для AAD-1

<400> 17

Tyr Gln Ala Gln Asn Arg
1 5

<210> 18

```

/ <211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y8 для пептиду T9 для AAD-12

<400> 18

Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y5 для пептиду T19 для AAD-12

<400> 19

Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y7 для пептиду T4 для AAD-12

<400> 20

Val Ala Ile Ser Asn Val Lys
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y8 для пептиду T22 для Cry1F

<400> 21

Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y10 для пептиду T22 для Cry1F

<400> 22

```

Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 23
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y6 для пептиду T46 для Cry1F

<400> 23

Ala Gly Gln Phe Asn Lys
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y5 для пептиду t7 для Cry34

<400> 24

Asn Asp Gln Ile Lys
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y6 для пептиду T7 для Cry34

<400> 25

Ala Asn Asp Gln Ile Lys
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y8 для пептиду T9 для Cry35

<400> 26

Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> БІЛОК


```

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y10 для пептиду T9 для Cry35

<400> 27

Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg
1          5          10

<210> 28
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y9 для пептиду T10 для PAT

<400> 28

Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
1          5

<210> 29
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y10 для пептиду T2 для PAT

<400> 29

Pro Gln Glu Trp Ile Asp Asp Leu Glu Arg
1          5          10

<210> 30
<211> 10
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y10 для пептиду T8 для PAT

<400> 30

Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys
1          5          10

<210> 31
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Фрагмент Y7 для Cry1F

<400> 31

```

```

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1          5

```

```

<210> 32
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Фрагмент Y7 для PAT

```

```

<400> 32

```

```

Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
1          5

```

```

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1          5

```

```

<210> 32
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Фрагмент Y7 для PAT

```

```

<400> 32

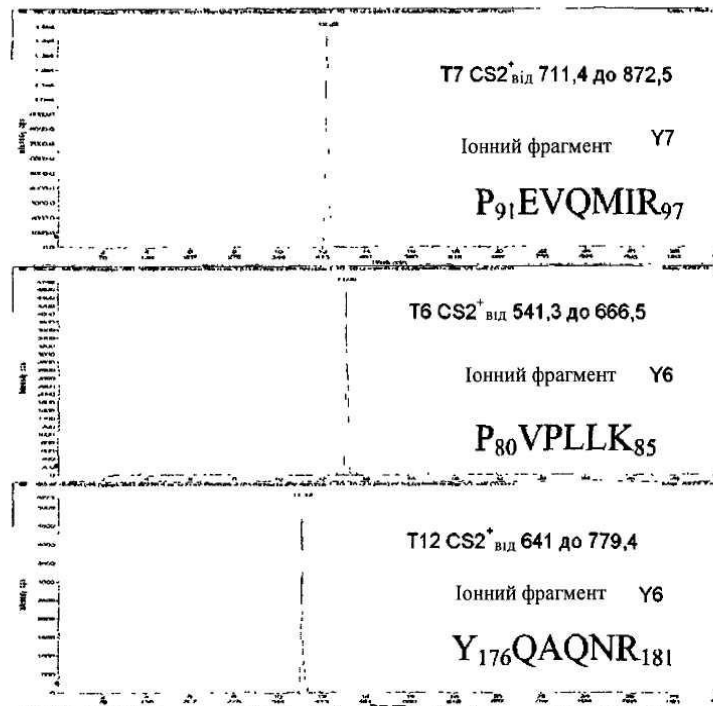
```

```

Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
1          5

```

Виявлення мультиплексованих пептидів/іонних фрагментів білка AAD-1



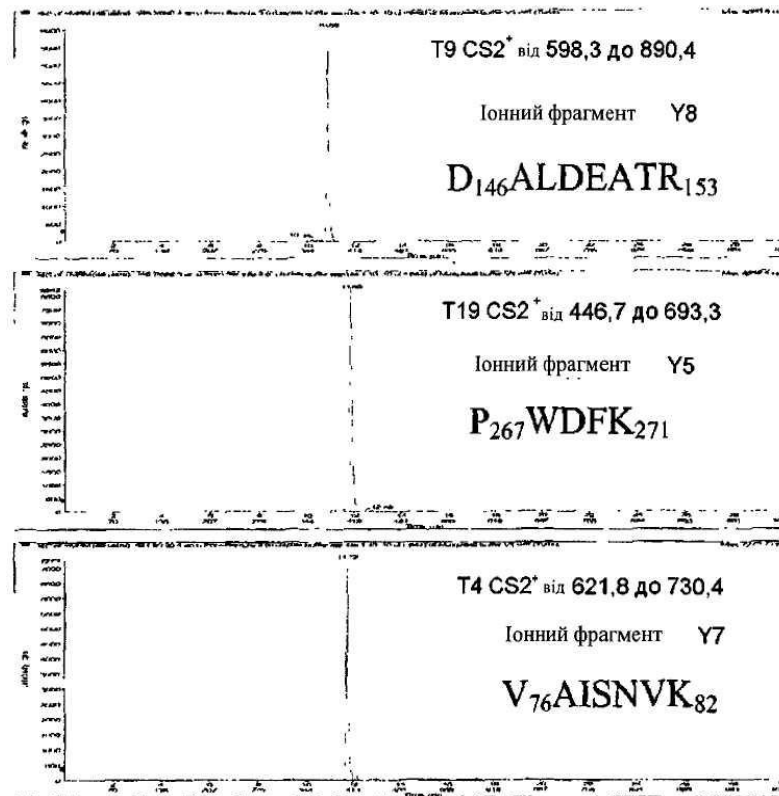
Білок/мультиплексовані пептиди

AAD-1 ((R)-2,4-дихлорфеноксипропіонат діоксигеназа)

T6 FGPVDPVPLLK
T7 SIEGYPEVQMIR
T12 VFGSLYQAQNR

Фіг. 1

Виявлення мультиплексованих пептидів/іонних фрагментів білка AAD-12



AAD-12 (S-2,4-дихлорфеноксипропіонат/альфа-кетоглутарат
діоксигеназа)

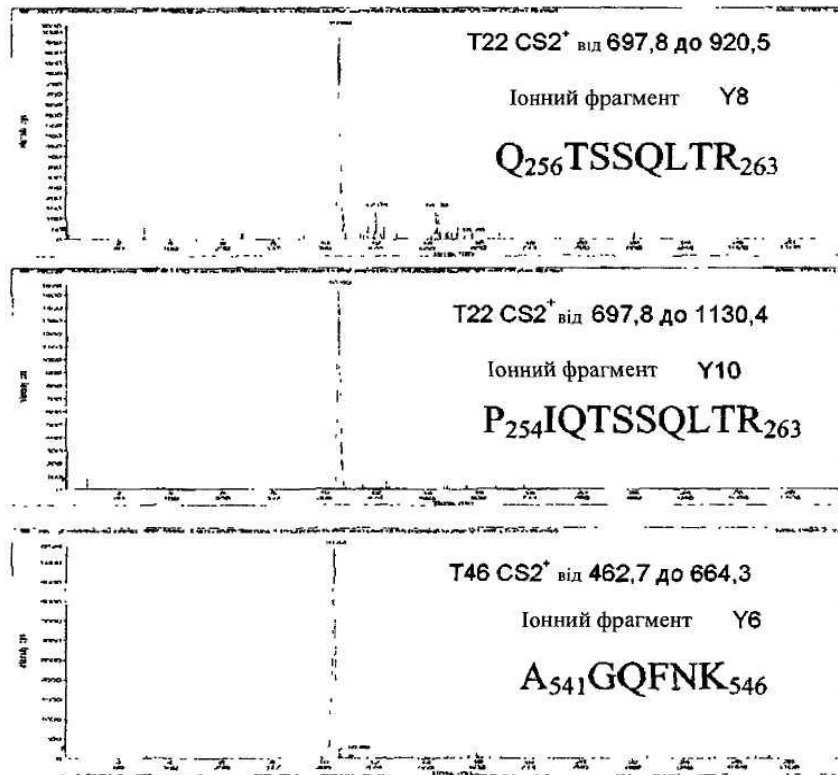
T4 IGGDIVAISNVK

T9 AAYDALDEATR

T19 AEPWDFK

Фіг. 2

Виявлення мультиплексованих пептидів/іонних фрагментів білка Cry1F



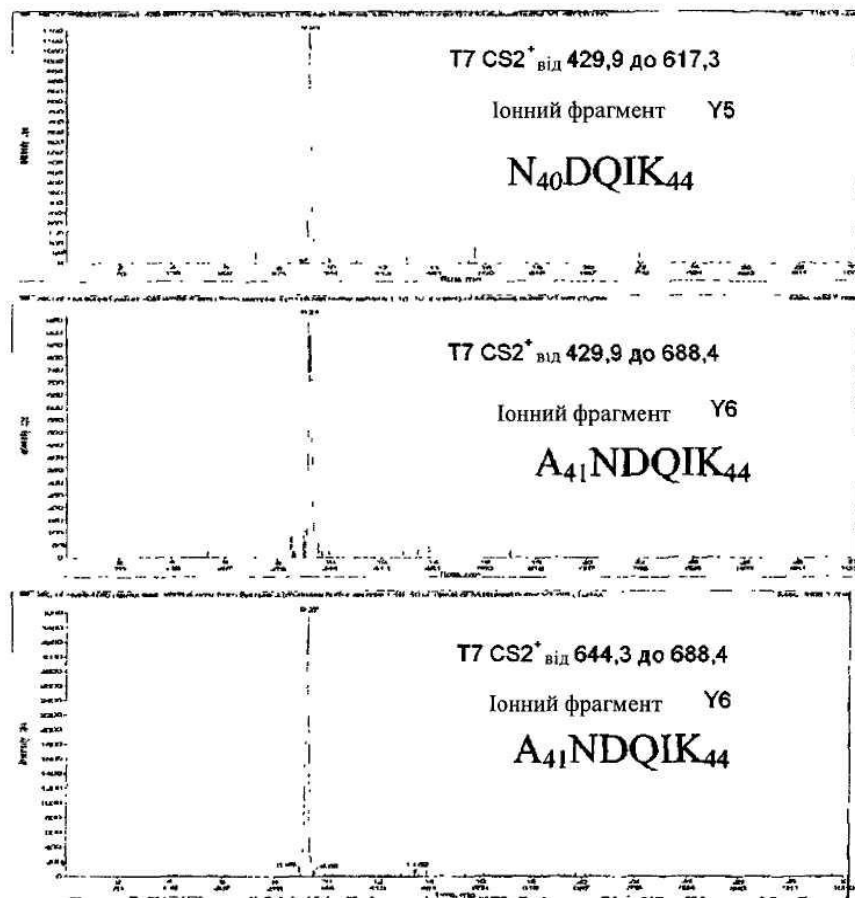
Cry1F (пестицидний кристалічний білок Cry1 Fa (інсектицидний дельта-ендотоксин Cry1F(a)))

T22 TYPIQTSSQLTR

T46 IFAGQFNK

Fig. 3

Виявлення мультиплексованих пептидів і іонних фрагментів білка Cry34

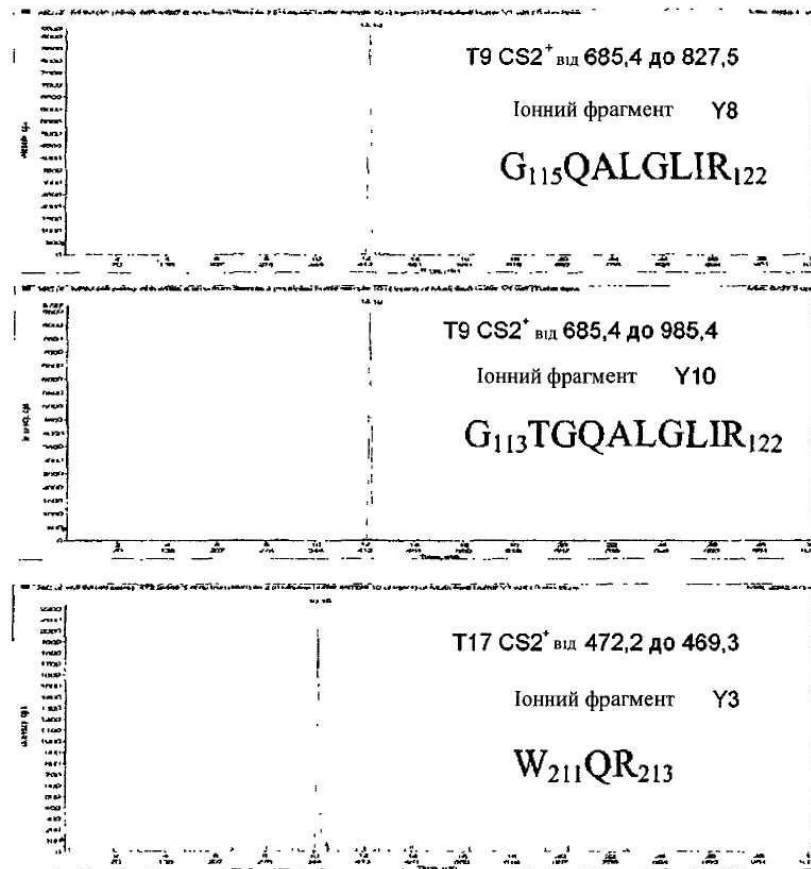


Cry34 (кристалічний білок ET79 [Bacillus thuringiensis])

T7 TSPTNVANDQIK

Фіг. 4

Виявлення мультиплексованих пептидів/іонних фрагментів білка Cry35



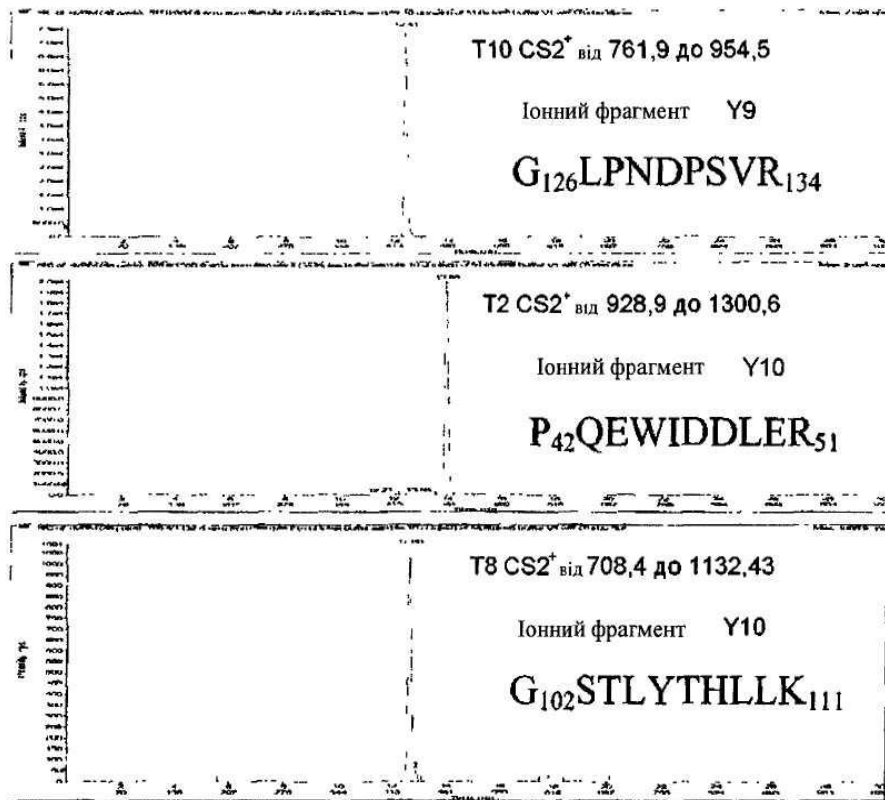
Cry34 (Cry35Ab-подібний [Bacillus thuringiensis])

T9 VLTAGTGQALGLIR

T17 YQYWQR

Фіг. 5

Виявлення мультиплексованих пептидів/іонних фрагментів білка ФАТ



ФАТ (фосфінотрицин N-ацетилтрансфераза (PPT N-ацетилтрансфераза))

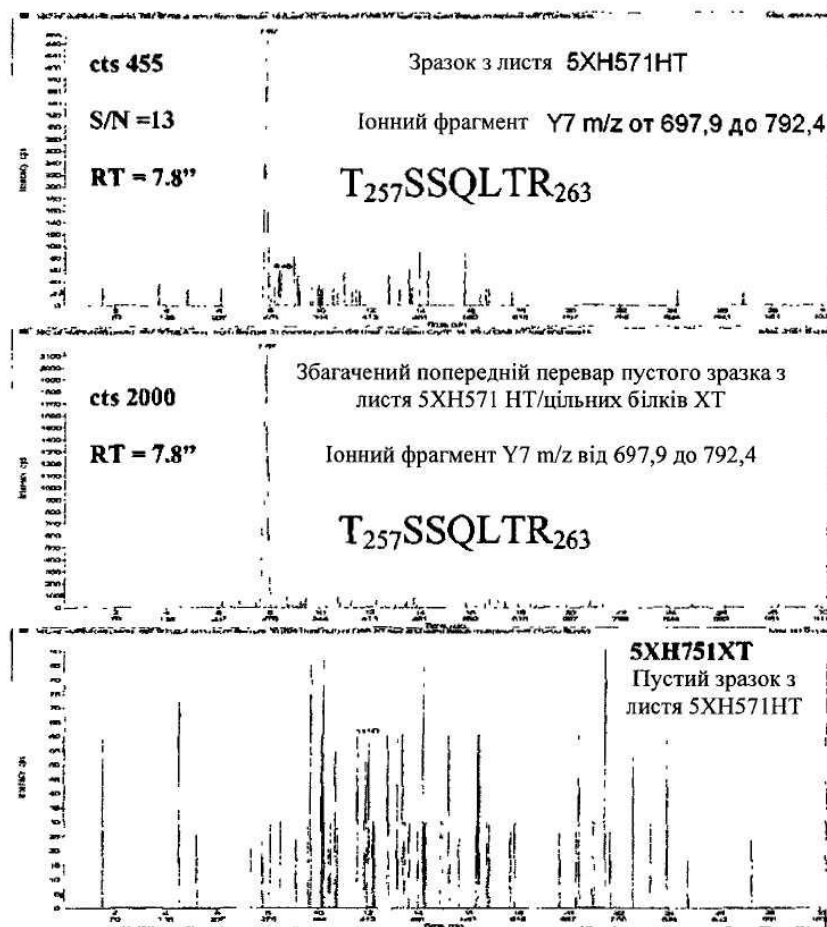
T2 TERQTPQEWIDDLER

T8 LGLGSTLYTHLLK

T10 SVVAVIGLPNDPSVR

Фіг. 6

Виявлення Cry1F в інбредній лінії 5XH571HT

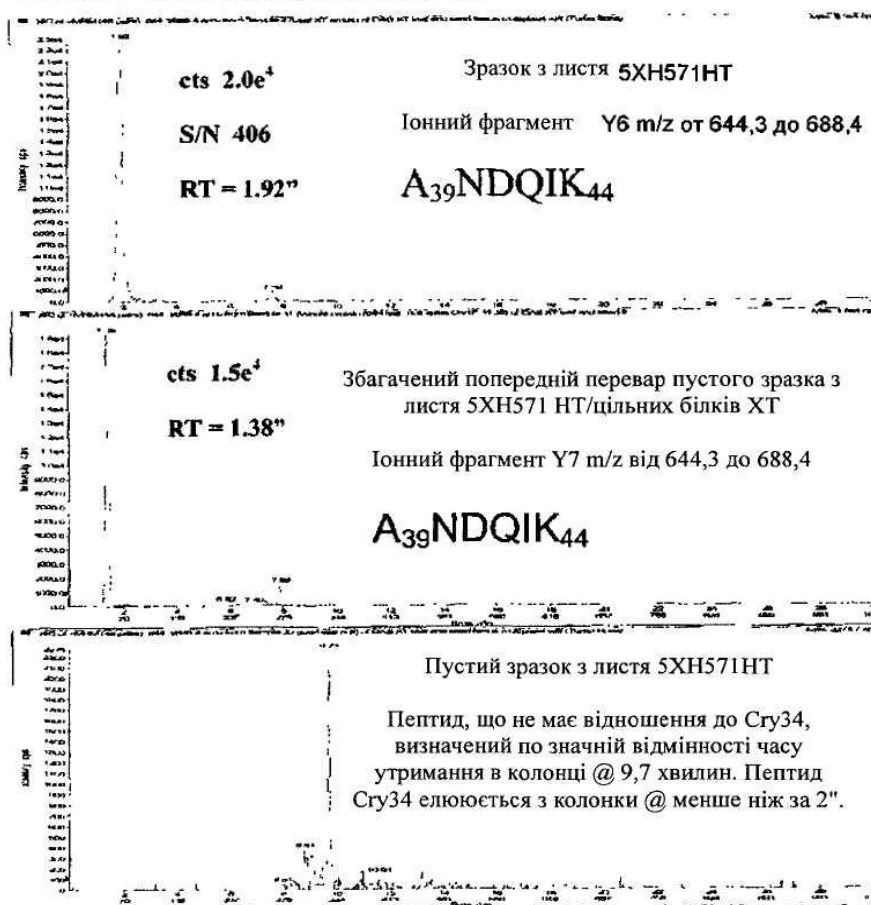


Cry1F (пестицидний кристалічний білок Cry1Fa (інсектицидний дельта-ендотоксин Cry1F(a))

T22 TYPIQTSSQLTR

Фіг. 7

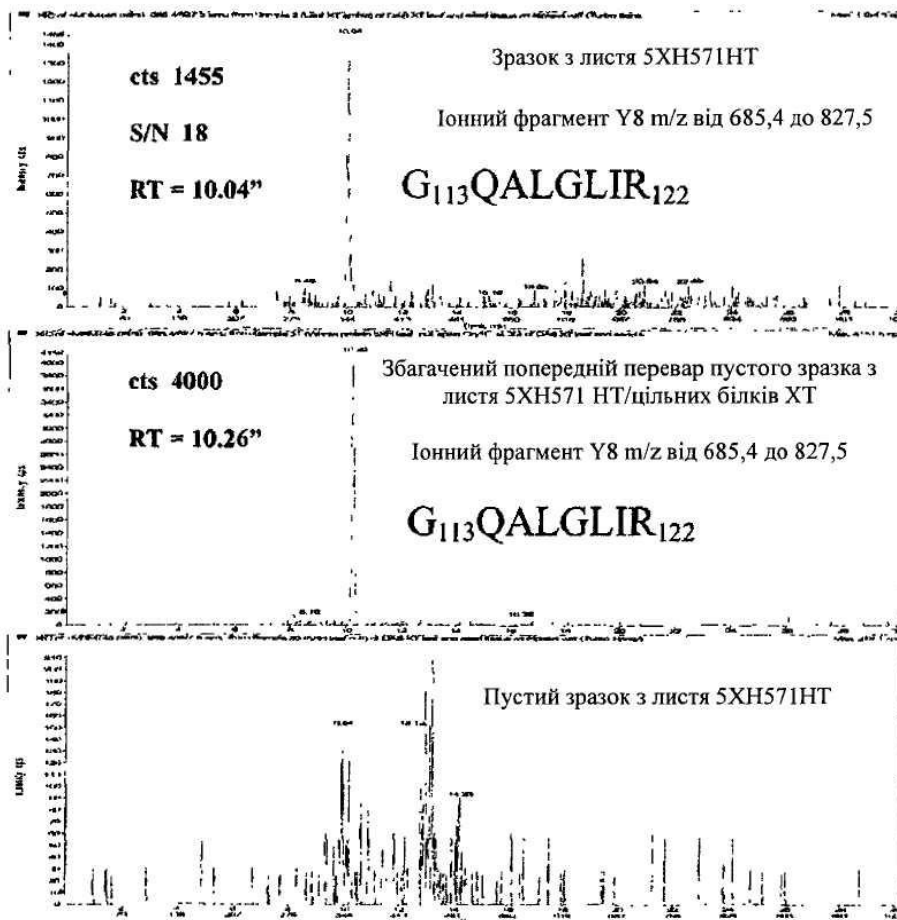
Виявлення Cry34 в інбредній лінії 5XH571HT

Cry34 (кристалічний білок ET79 [*Bacillus thuringiensis*])

T7 TSPTNVANDQIK

Фіг. 8

Виявлення Cry35 в інбредній лінії 5XH571HT

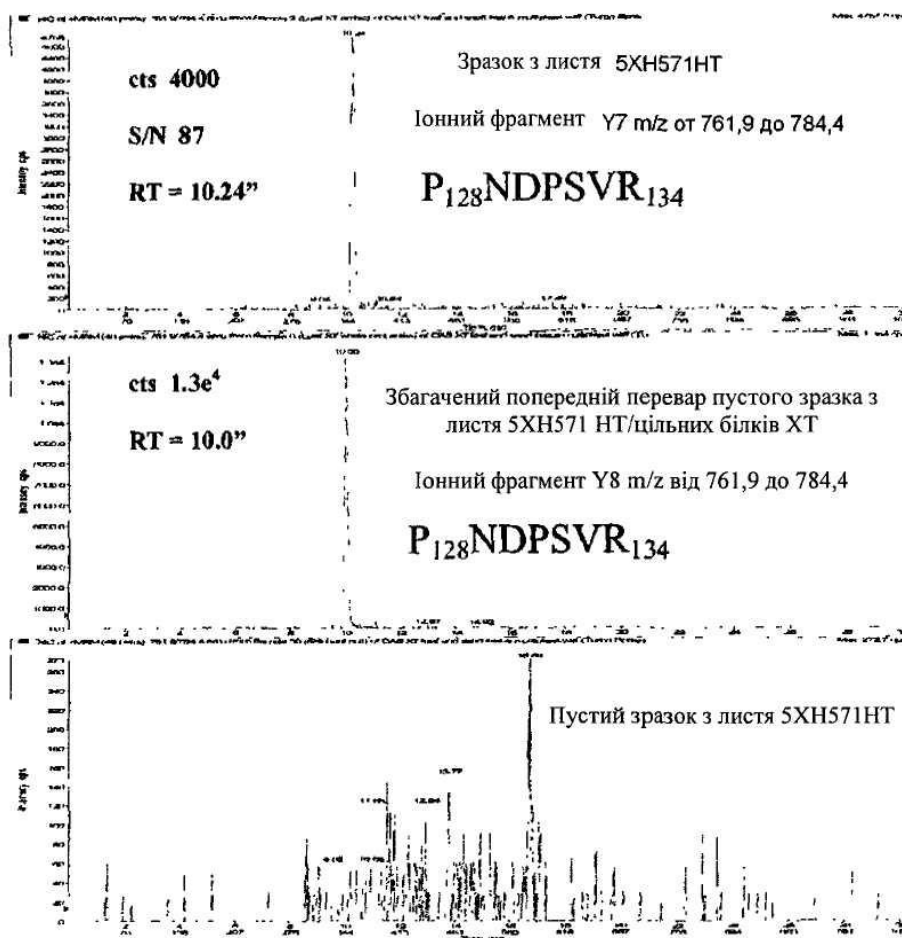


Cry35 (Cry35-подібний [*Bacillus thuringiensis*])

T9 VLTAGTGQALGLIR

Fig. 9

Виявлення ФАТ в інбредній лінії 5ХН571НТ



ФАТ (фосфінотрицин N-ацетилтрансфераза (PPT N-ацетилтрансфераза))

T10 SVVAVIGLPNDPSVR

Фіг. 10

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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