



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122764** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)

C12C 12/00

C12C 1/02 (2006.01)

A23L 7/10 (2016.01)

A01H 5/08 (2018.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 00247</p> <p>(22) Дата подання заявки: 13.06.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 07.01.2021</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2013902140, 2013902565</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13.06.2013, 11.07.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: AU, AU</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.07.2016, Бюл.№ 14</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 06.01.2021, Бюл.№ 1</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/AU2014/000619, 13.06.2014</p>	<p>(72) Винахідник(и): Таннер Грегорі Джон (AU), Хауітт Кріспін Александер (AU), Колгрейв Мішель Лайза (AU), Бланделл Малколм Джеймс (AU)</p> <p>(73) Володілець (володільці): КОММОНВЕЛТ САЙНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІЕЛ РІСЕРЧ ОРГАНІЗЕЙШН, Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2612, Australia (AU), ГРЕЙНЗ РІСЕРЧ ЕНД ДІВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН, Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory 2600, Australia (AU)</p> <p>(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009/021285 A1, 19.02.2009 EP 1210869 A1, 05.06.2002 US 2012/034339 A1, 09.02.2012 US 2011/135784 A1, 09.06.2011 Brennan C S et al, "The production and characterisation of Hor 3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance", Journal of Cereal Science, Academic Press Ltd, GB, 01.11.1998, vol. 28, no. 3, P. 291 - 299 G. J. Tanner et al, "Dissecting the T-cell response to hordeins in coeliac disease can develop barley with reduced immunotoxicity", Alimentary Pharmacology & Therapeutics., GB, 15.09.2010, vol. 32, no. 9, P. 1184 - 1191</p>
---	---

(54) ЯЧМІНЬ З ДУЖЕ НИЗЬКИМ ВМІСТОМ ГОРДЕЇНІВ ТА ХАРЧОВИЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВІ СОЛОДУ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання харчового інгредієнта або інгредієнта напою на основі солоду або харчового продукту або напою на основі солоду, причому спосіб включає (i) переробку ячмінного зерна, що містить 50 м. ч. або менше гордеїнів, для одержання солоду, сусла, борошна або цільнозернового борошна та/або (ii) змішування ячмінного зерна або солоду, сусла, борошна або цільнозернового борошна, одержаних із вказаного зерна, зі щонайменше одним іншим харчовим інгредієнтом або інгредієнтом напою, причому ячмінне

UA 122764 C2

зерно, солод, сусло, борошно або цільозернове борошно містять 50 м. ч. або менше гордеїнів, тим самим одержуючи харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду, харчовий продукт або напій на основі солоду. Винахід також стосується рослини ячменю, яка продукує зерно, що містить близько 50 м. ч. або менше загальних гордеїнів; способу отримання зерна ячменю; харчового інгредієнту або інгредієнту напою на основі солоду або харчового продукту або напою-продукту на основі солоду, одержаних з рослини ячменю або зерна.

ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ ВІНАХОДУ

Цей винахід відноситься до способів отримання харчових продуктів або напоїв на основі солоду, які придатні для споживання суб'єктом із захворюванням целиакією. Зокрема, цей винахід відноситься до способів отримання харчових продуктів або напоїв на основі солоду з дуже низьким вмістом гордеїнів. У цьому винаході також представлені рослини ячменю, які продукують зерно, що може використовуватися у способах за цим винаходом.

РІВЕНЬ ТЕХНИКИ

Захворювання целиакією (ЗЦ) являє собою ентеропатію, опосередковану Т-клітинами, яка стимулюється споживанням проламінів зернових, таких як пшениця, ячмінь та жито. Клінічні симптоми ЗЦ включають втомлюваність, діарею, здуття живота, втрату маси тіла, анемію та неврологічні порушення (Green et al., 2006). ЗЦ пов'язане з підвищеною частотою виникнення шлунково-кишкових злоякісних утворень, таких як 10-кратне збільшення ризику раку кишечника, від 3- до 6-кратного збільшення ризику неходжкінської лімфоми та 28-кратне збільшення ризику Т-клітинної лімфоми кишечника (Green et al., 2009), а також підвищеною частотою виникнення анемії, остеопорозу, неврологічних розладів і додаткових аутоімунних порушень, таких як діабет (Skovbjerg et al., 2005). У випадку найбільш вивчених білків проламіну, α -гліадину, токсичність у значній мірі опосередкована єдиним глутаміном в єдиному пептиді (Anderson et al., 2000; Shan et al., 2002), який викликає руйнівний каскад реакцій, які у кінцевому рахунку пошкоджують ворсинки тонкого кишечника, знижуючи поглинання поживних речовин та впливаючи на здоров'я. До теперішнього часу детально картовані токсичні епітопи целиації для всіх відомих білків проламінів пшениці, ячменю та жита з використанням незміщених популяцій Т-клітин, виділених з периферійної крові HLA-DQ2⁺ хворих целиакією після короточасного прийому в їжу пшениці, ячменю та жита (Tye-Din et al., 2010). Неочікувано виявилось, що лише три високоімунногенні пептиди, які походять з α -гліадину (ELQPFPPQPELPYPQPQ, SEQ ID №: 1), ω -гліадину/С-гордеїну (EQPFPPQPEQPFWQP, SEQ ID №: 2) та В-гордеїну (EPERPIEQPQPYPQQ, SEQ ID №: 3), можуть забезпечувати 90% целиакієспецифічної реакції, викликані повним набором білків пшениці, ячменю і жита.

Єдиним сучасним методом лікування ЗЦ є виключення, яке триває все життя, харчового глютену, що складається з родини подібних білків, виявлених у пшениці (гліадини, глютеніни), жита (секаліни), ячменю (гордеїни) та вівси (авеніни). Однак, такі типи дієт є високовартісними (Lee et al., 2007) та пов'язаними з низьким споживанням харчових волокон і високим споживанням цукрів (Kupfer et al., 2005; Wild et al., 2010; Ohlund et al., 2010), які самі по собі несуть ризики для здоров'я. Виключення харчового глютену призводить до нормалізації медичної статистики у більшості, але не у всіх хворих целиакією (Lanzini et al., 2009; Rubio-Tapia et al., 2010). Близько 1 % із більшості популяцій у всьому світі страждають від захворювання целиакією, однак, залишається до 50 % дорослих з недіагностованим захворюванням або таких, що не проявляють явних симптомів (Catassi et al., 1994; Fowell et al., 2006).

Основні родини білків насіння у зернових культур Triciceae представлені альбумінами, глобулінами та глютеніноподібними білками, збирально названими проламінами (Shewry та Tatham, 1990). Альбуміни та глобуліни широко розповсюджені серед квіткових рослин, але проламіни обмежено зустрічаються у трав'янистих рослинах, зокрема у підродині Pooideae (Hausch et al., 2002). Проламіни так названі через те, що вони містять високе співвідношення амінокислот проліну і глутаміну, що перешкоджають протеолізу під час травлення (Hausch et al., 2002). Ген α -гліадину був першим клонованим геном проламіну і, у теперішній час, багато відомо про роль цього білка при захворюванні целиакією (Kasarda et al., 1984). Токсичність цього проламіну зосереджена на єдиному пептиді 57-QLQPFPPQQLPYPQPQS-73 (SEQ ID №: 4) із залишком глутаміну Q65, який є ключовою амінокислотою. Мутація цього єдиного глутаміну на, наприклад, лізин ліквідує целиакальну токсичність цього проламіну (Anderson et al., 2000). Частково гідролізовані пептиди проходять через епітелій та досягають власну пластинку слизової оболонки завдяки невідомому механізму; тут Q65 дезамідується за допомогою тканинної трансглутамінази (tTG) з утворенням E65 (глутамат), збільшуючи імуностимулюючий потенціал пептиду (Skovbjerg et al., 2004). Негативний заряд полегшує зв'язування пептиду з рецепторами DQ2 (або рідше DQ8) на поверхні антигенпрезентуючих клітин, забезпечуючи презентацію пептидів особливим глютеноспецифічним, обмеженим за DQ2, CD4⁺ Т-клітинам, які націлені на кишечник. Активовані таким чином CD4⁺ Т-клітини проходять клональне розмноження та, у свою чергу, сприяють розмноженню глютеноспецифічних та TG2-специфічних В-клітин з результируючою продукцією анти-TG2 та антиглютенінових антитіл, характерних для захворювання целиакією. Клітинно-опосередкована Th1-реакція відбувається за посередництва секретії запальних цитокінів (Tjon et al., 2010). Таким чином, проста білкова взаємодія, полегшена введенням єдиного негативно зарядженого залишку, ініціює серії

специфічних і направлених каскадів, що у кінцевому рахунку призводять до руйнування кишкових ворсинок.

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) являє собою повсюдно культивовану зернову культуру, яка використовується для одержання солоду для пивоваріння та харчової промисловості. Осолоджений ячмінь є основним інгредієнтом у пиві, забезпечуючи вуглеводне джерело для ферментації. Нажаль, для хворих целиакією ячмінне пиво також містить низьку, але целиакальну токсичну концентрацію гордеїну (глютену) (Dostalek et al., 2006). Гордеїни відповідають за половину білка ячмінного зерна (Moravcova et al., 2009) і складаються з чотирьох мультигенних родин: В-гордеїни (30-45 кДа; 70% вмісту гордеїну) та С-гордеїни (45-75 кДа; 20% вмісту гордеїну) переважають у складі гордеїну зерна, тоді як D- (105 кДа) та γ-гордеїни (35-40 кДа) є мінорними компонентами (Shewry et al., 1999). Осолоджене сорго, пшоно та гречка використовуються як безглютенові альтернативні варіанти для одержання пива (Wijngaard et al., 2007), однак, для цих зернових культур складно отримати відтворювану якість і низьку вартість одержання як для ячмінного пива.

Стандартне визначення ВООЗ для безглютенових харчових продуктів, прийняте Кодексом Аліментаріус у 2008 р., вимагає щоб «безглютеновим» маркувався харчовий продукт, приготований з зернових культур, таких як пшениця і ячмінь, повинен містити менше 20 мг/кг (20 м.ч.) глютену. Точний кількісний метод для оцінки вмісту глютену у харчових продуктах і напоях з використанням мас-спектрометрії представлений Colgrave et al. (2012).

У публікації WO2009/021285 описано отримання зерна ячменю, в якому було зменшено вміст гордеїну до менше 10 % від вмісту у зерні дикого типу, особливо за гордеїнами В та С. Однак, залишається необхідність у зерні з набагато меншими концентраціями гордеїнів для одержання харчових продуктів і напоїв, які можуть споживатися людьми з ЗЦ.

Отже, існує необхідність в ячмені зі значно більш низьким вмістом індукуючих ЗЦ гордеїнів, який міг би використовуватися у харчових продуктах та напоях для чутливих до ЗЦ суб'єктів.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Ці винахідники отримали зерно ячменю з дуже низьким вмістом гордеїнів. Це зерно може використовуватися для одержання великого розмаїття харчових продуктів та напоїв на основі солоду, які можуть бути спожиті суб'єктами, що страждають від захворювання целиакією.

У першому аспекті у цьому винаході представлено спосіб одержання харчового інгредієнта або інгредієнта напою на основі солоду, або харчового продукту або напою на основі солоду, причому спосіб включає (i) переробку ячмінного зерна для одержання солоду, сусла, муки або цільнозернової крупи та/або (ii) змішування ячмінного зерна або солоду, сусла, муки або цільнозернової крупи, одержаних із вказаного зерна, з щонайменше одним іншим харчовим інгредієнтом або інгредієнтом напою, причому ячмінне зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять близько 50 м.ч. або менше гордеїнів, тим самим одержуючи харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду, харчовий продукт або напій на основі солоду.

В аспекті у цьому винаході представлено спосіб одержання харчового інгредієнта або інгредієнта напою на основі солоду, харчового продукту або напою на основі солоду, причому спосіб включає (i) переробку ячмінного зерна, що містить близько 50 м.д. або менше гордеїнів, для одержання солоду, сусла, муки або цільнозернової крупи та/або (ii) змішування ячмінного зерна або солоду, сусла, муки або цільнозернової крупи, одержаних із вказаного зерна, з щонайменше одним іншим харчовим інгредієнтом або інгредієнтом напою, причому ячмінне зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять близько 50 м.ч. або менше гордеїнів, тим самим одержуючи харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду, харчовий продукт або напій на основі солоду.

У варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять близько 20 м.ч. або менше, близько 10 м.ч. або менше, близько 5 м.ч. або менше, від близько 0,05 м.ч. до близько 50 м.ч. або від близько 0,05 м.ч. до близько 20 м.ч., від близько 0,05 м.ч. до близько 10 м.ч., від близько 0,05 м.ч. до близько 5 м.ч., від близько 0,1 м.ч. до близько 5 м.ч., близько 3,9 м.ч. або близько 1,5 м.ч. гордеїнів.

В іншому варіанті реалізації винаходу середня маса зернівки складає щонайменше близько 35 мг, щонайменше близько 39 мг, щонайменше близько 41 мг, щонайменше близько 47 мг, від близько 35 мг до близько 60 мг, від близько 40 мг до близько 60 мг, від близько 45 мг до близько 60 мг, близько 39,1 мг, близько 41,8 мг або близько 47,2 мг.

У додатковому варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять 20 м.ч. або менше гордеїнів, а середня маса зернівки складає від близько 40 мг до близько 60 мг. В іншому варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять 20 м.ч. або менше гордеїнів, а середня маса зернівки складає від

близько 45 мг до близько 60 мг. Спеціальне згадування цих комбінацій не виключає інші комбінації цих ознак.

У додатковому варіанті реалізації винаходу щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 %, від близько 80 % до близько 98 % або від близько 80 % до близько 93 % зерна не проходить через сито з розміром комірок 2,8 мм.

У додатковому варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять 20 м.ч. або менше гордеїнів, середня маса зернівки складає від близько 40 мг до близько 60 мг та щонайменше близько 80% зерна не проходить через сито з розміром комірок 2,8 мм. В іншому варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять 20 м.ч. або менше гордеїнів, середня маса зернівки складає від близько 45 мг до близько 60 мг та щонайменше близько 80 % зерна не проходить через сито з розміром комірок 2,8 мм. Спеціальне згадування цих комбінацій не виключає інші комбінації цих ознак.

У ще одному додатковому варіанті реалізації винаходу зерно отримане з рослини, яка має збиральний індекс щонайменше 40 %, від близько 40 % до близько 60 %, від близько 40 % до близько 55 % або від близько 40 % до близько 50 %. У переважному варіанті реалізації винаходу зерно отримане з рослини, яка має збиральний індекс від близько 40 % до близько 50 %.

В іншому варіанті реалізації винаходу зерно має співвідношення довжини до товщини менше ніж близько 5, менше ніж близько 4, менше ніж близько 3,8; від близько 2 до близько 5 або від близько 2,5 до близько 3,8.

У додатковому варіанті реалізації винаходу мука або цільнозернова крупа, одержана із зерна, містить близько 10 м.ч. або менше, близько 5 м.ч. або менше, від близько 0,05 м.ч. до близько 10 м.ч. або від близько 0,05 м.ч. до близько 5 м.ч., близько 3,9 м.ч. або близько 1,5 м.ч. гордеїнів.

У варіанті реалізації винаходу солод або сусло, одержане із зерна, містить менше ніж близько 50 м.ч. або менше ніж близько 20 м.ч. гордеїнів.

У додатковому варіанті реалізації винаходу зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, містять концентрацію менше 10 %, менше 5 % або менше 2 % від концентрації дикого типу, або в них присутній один або більше одного або всі з:

i) В-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 53,
 ii) В-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 54,
 iii) С-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 55, та
 iv) D-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 56,
 причому кожна з концентрацій складає менше 10 %, менше 5 % або менше 2 % відносно концентрації в ячмінному зерні дикого типу або солоді, суслі, муці або цільнозерновій крупі, одержаним з вказаного зерна, що відноситься до різновидів ячменю Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander.

У варіанті реалізації винаходу В-гордеїни представлені щонайменше В1-гордеїном (наприклад, таким, що містить амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 78) та В3-гордеїном (наприклад, таким, що містить амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 79). У додатковому прикладі С-гордеїни містять амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 80. У ще одному іншому прикладі D-гордеїни містять амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 76.

У варіанті реалізації винаходу зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, додатково містять концентрацію менше 10 %, менше 5 % або менше 2 % від концентрації дикого типу, або в них додатково відсутні:

i) γ-гордеїни, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 57, та/або
 ii) авеніноподібні А-білки, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 52,

причому кожна з концентрацій складає менше 10 %, менше 5 % або менше 2 % відносно концентрації в ячмінному зерні дикого типу або солоді, суслі, муці або цільнозерновій крупі, одержаним з вказаного зерна, що відноситься до різновидів ячменю Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander. В одному прикладі γ-гордеїни містять амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 81. У ще одному іншому прикладі авеніноподібні А-білки містять амінокислотну послідовність, представлену як SEQ ID №: 84.

Переважно у вищенаведеному варіанті реалізації винаходу наведені γ-гордеїни γ1-гордеїни та γ2-гордеїни.

У варіанті реалізації винаходу зерно є гомозиготним за алелем локусу Hor2, в якому більшість або всі кодуєчі В-гордеїни гени видалені, або солод, сусло, мука або цільнозернова

круп, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає алель локусу *Hor2*, в якому більшість або всі кодуючі *B*-гордеїни гени видалені.

В іншому варіанті реалізації винаходу зерно є гомозиготним за нульовим алелем гена, що кодує *D*-гордеїн в локусі *Hor3*, або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає нульовий алель гена, який кодує *D*-гордеїн, при цьому нульовий алель переважно містить стоп-кодон, мутацію сайту сплайсингу, мутацію із зсувом рамки, інсерцію, делецію або кодує усічений *D*-гордеїн, або в ньому більшість або всі кодуючі *D*-гордеїни гени видалені.

У додатковому варіанті реалізації винаходу усічений *D*-гордеїн має стоп-кодон у триплеті, що кодує амінокислоту номер 150.

В іншому варіанті реалізації винаходу зерно є гомозиготним за алелем у локусі *Lys3* ячменю, що призводить до відсутності у зерні *C*-гордеїнів, або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає алель у локусі *Lys3*.

У додатковому варіанті реалізації винаходу зерно, солод, сусло, мука або цільнозернова крупа містять близько 1 % або менше, близько 0,01 % або менше, близько 0,007 % або менше, близько 0,0027 % або менше, від близько 0,001 % до близько 1 %, від близько 0,001 % до близько 0,01 %, близько 0,007 % або близько 0,0027 % концентрації гордеїнів у порівнянні з зерном із відповідної рослини ячменю дикого типу, або солодом, суслом, мукою або цільнозерновою крупкою, одержаними таким самим способом із зерна із відповідної рослини ячменю дикого типу.

У ще одному іншому варіанті реалізації винаходу зерно одержано з рослини, яка має щонайменше 60 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 %, від близько 60 до 100 %, від близько 70 до 100 %, від близько 80 до 100 %, близько 60 %, близько 70 %, близько 80 % або близько 90 % врожайності зерна рослини ячменю дикого типу.

В іншому варіанті реалізації винаходу середня маса зернівки складає щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 % або близько 100 % зернівки рослини ячменю дикого типу.

У ще одному додатковому варіанті реалізації винаходу зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, містять близько 10 % або менше, близько 5 % або менше, близько 2 % або менше, від близько 0,1 % до близько 10 % або від близько 0,1 % до близько 10 % одного або більше одного або всіх із наступних компонентів у порівнянні з відповідною рослиною ячменю дикого типу:

- i) *B*-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 53,
- ii) *B*-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 54,
- iii) *C*-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 55, та
- iv) *D*-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 56.

В іншому варіанті реалізації винаходу зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, додатково містять близько 10 % або менше, близько 5 % або менше, близько 1 % або менше, від близько 0,1 % до близько 10 % або від близько 0,1 % до близько 10 % з наступних компонентів у порівнянні з відповідною рослиною ячменю дикого типу:

- i) γ -гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 57, та/або
- ii) авеніноподібних *A*-білків, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 52.

В іншому варіанті реалізації винаходу зерно або солод, сусло, мука або цільнозернова крупа, одержані з вказаного зерна, додатково містять γ 3-гордеїн у кількості близько 60 % або менше у порівнянні з кількістю у відповідній рослині ячменю дикого типу, γ 3-гордеїн, що містить амінокислоти, послідовність яких представлена як SEQ ID №: 58, такий як γ 3-гордеїн, що містить амінокислоти, послідовність яких представлена як SEQ ID №: 83.

Приклади рослини ячменю дикого типу включають, але не обмежуються сортами *Bomi*, *Sloop*, *Baudin*, *Yagan*, *Hindmarsh* або *Commander*.

В іншому варіанті реалізації винаходу вміст крохмалю зерна складає щонайменше близько 50% (мас./мас.). Переважно вміст крохмалю зерна складає від близько 50% до близько 70% (мас./мас.).

У додатковому варіанті реалізації винаходу ціліакальна токсичність муки, одержаної з цього зерна, складає менше ніж близько 5% або менше ніж близько 1% відносно муки, одержаної із зерна відповідної рослини ячменю дикого типу.

У додатковому варіанті реалізації винаходу середня маса зернівки складає щонайменше в 1,05 раз, щонайменше в 1,1 рази або від 1,05 до 1,3 раз більше, ніж маса зернівки, яка є

- i) гомозиготною за алелем локусу *Hor2*, в якому більшість або всі кодуючі *B*-гордеїни гени видалені,

ii) гомозиготною за алелем в локусі Lys3 ячменю, що призводить до відсутності у зерні С-гордеїнів, та

iii) гомозиготною за алелем дикого типу D-гордеїну, кодуючим повнорозмірний білок.

У ще одному додатковому варіанті реалізації винаходу зерно одержане з рослини, яка має врожайність зерна щонайменше в 1,20 раз або щонайменше 1,35 раз, або від 1,2 до 1,5 раз, або від 1,2 до 2,0 раз більше, ніж врожайність зерна з рослини, яка є

i) гомозиготною за алелем локусу Hor2, в якому більшість або всі кодуючі В-гордеїни гени видалені,

10 ii) гомозиготною за алелем в локусі Lys3 ячменю, що призводить до відсутності у зерні С-гордеїнів, та

iii) гомозиготною за алелем дикого типу D-гордеїну, кодуючим повнорозмірний білок.

Наприклад, приймаючи до уваги два вищенаведених варіанти реалізації винаходу, зерно з ознаками, визначеними у пп. від i) до iii) може бути зерном G1*, описаним у публікації WO 2009/021285.

15 В іншому варіанті реалізації винаходу щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 % або щонайменше близько 95 % генома зерна ячменю ідентично геному ячменю сорту дикого типу такого, як, але не обмеженого Sloop, Hindmarsh, Oxford або Maratime.

У варіанті реалізації винаходу зерно отримано від нетрансгенної рослини.

20 В альтернативному варіанті реалізації винаходу зерно отримано від трансгенної рослини.

У додатковому варіанті реалізації винаходу рослина містить трансген, що кодує полінуклеотид, який пригнічує у зерні продукцію щонайменше одного гордеїну. Переважно, полінуклеотид цього варіанту реалізації винаходу являє собою антисмисловий полінуклеотид, смисловий полінуклеотид, каталітичний полінуклеотид, штучну мікроРНК або дуплексну молекулу РНК, яка пригнічує експресію одного або переважно більше генів, кодуючих гордеїни.

25 В іншому варіанті реалізації винаходу спосіб включає одержання з такого зерна муки або цільозернової крупи.

У додатковому варіанті реалізації винаходу спосіб включає одержання з такого зерна солоду.

30 У варіанті реалізації винаходу напій на основі солоду являє собою пиво, а спосіб включає пророщування зерна або подрібнення одержаного таким чином зерна. У варіанті реалізації винаходу спосіб додатково включає фракціонування висушеного пророщеного зерна на дві і більше фракції ендосперму, фракції ендотеліального шару, фракції лушпиння, фракції проростків і фракції солодових ростків, та з'єднання і змішування попередньо визначених кількостей двох або більше з цих фракцій.

35 У варіанті реалізації винаходу щонайменше близько 50 % зерна проростає у межах 3 діб після набухання.

У додатковому варіанті реалізації винаходу харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду являє собою муку, крохмаль, солод або сусло, або харчовий продукт являє собою хлібопродукти на заквасці або без закваски, макаронні вироби, локшину, сухі сніданки, закусочні харчові продукти, коржі, кондитерські вироби або продукти, які містять соуси на основі муки.

У варіанті реалізації винаходу напій на основі солоду являє собою пиво або віскі.

45 У варіанті реалізації винаходу харчовий продукт або напій на основі солоду призначений для споживання людьми.

У додатковому варіанті реалізації винаходу після споживання такого харчового продукту або напою щонайменше один симптом захворювання целіакією не проявляється у суб'єкта з вказаним захворюванням.

50 В іншому аспекті у цьому винаході представлена рослина ячменю, яка продукує зерно, що містить близько 50 м.ч. або менше гордеїнів.

Представлено також зерно рослини ячменю за цим винаходом.

Зерно винаходу та/або зерно рослини ячменю за цим винаходом може містити одну або більше ознак, визначених вище.

55 У варіанті реалізації винаходу зерно ячменю здатне продукувати рослину ячменю за цим винаходом.

У варіанті реалізації винаходу зерно переробляється таким чином, що воно не здатне до пророщування.

У варіанті реалізації винаходу зерно є позбавленим оболонки.

60 В іншому аспекті у цьому винаході представлено спосіб отримання зерна ячменю, причому спосіб включає:

- а) вирощування рослини ячменю за цим винаходом,
- б) збір зерна та
- с) необов'язково, переробку зерна.

У варіанті реалізації винаходу спосіб включає вирощування щонайменше 10000 рослин у польових умовах на площі щонайменше один гектар.

В іншому аспекті у цьому винаході представлено спосіб одержання муки, цільнозернової крупи, крохмалю, солоду, сусла або іншого продукту, одержуваного із зерна, причому спосіб включає:

- а) отримання зерна за цим винаходом та
- б) переробку зерна для одержання муки, цільнозернової крупи, крохмалю, солоду, сусла або іншого продукту.

Представлено також продукт, отримуваний з рослини ячменю за цим винаходом або зерна за цим винаходом.

В одному варіанті реалізації винаходу продукт являє собою харчовий інгредієнт, інгредієнт напою на основі солоду, харчовий продукт або продукт-напій на основі солоду.

У варіанті реалізації винаходу продукт-напій на основі солоду являє собою пиво або віскі.

У додатковому варіанті реалізації винаходу продукт являє собою нехарчовий продукт. Приклади включають, але не обмежуються плівками, покриттями, адгезивними речовинами, будівельними матеріалами та пакувальними матеріалами.

Також представлено харчовий продукт або напій на основі солоду з використанням способу за цим винаходом.

В іншому аспекті винаходу представлено пиво, що містить один або більше білків зерна ячменю та менше 0,9 м.ч. гордеїнів.

У варіанті реалізації винаходу пиво містить щонайменше близько 2 %, щонайменше близько 3 %, щонайменше близько 4 % або щонайменше близько 5 % етанолу.

В іншому аспекті у цьому винаході представлена мука або цільнозернова крупа, що містить один або більше білків зерна ячменю та менше ніж близько 50 м.ч. або менше ніж близько 20 м.ч. гордеїнів.

В іншому аспекті у цьому винаході представлено солод або сусло, що містить один або більше білків зерна ячменю та менше ніж близько 50 м.ч. або менше ніж близько 20 м.ч. гордеїнів.

У додатковому аспекті у цьому винаході представлено метод ідентифікації алеля гена D гордеїну ячменю, який кодує усічений D гордеїн, причому спосіб включає

- i) отримання зразка, що містить нуклеїнову кислоту з рослини ячменю, та
- ii) проведення аналізу зразка на наявність або відсутність залишку гуаніну у положенні 450 відкритої рамки зчитування, кодуючої D гордеїн,

причому наявність гуаніну вказує на те, що ген D гордеїну кодує усічений D гордеїн.

У варіанті реалізації винаходу етап b) включає ампліфікацію геномної ДНК з використанням праймерів GGCAATACGAGCAGCAAAC (SEQ ID №: 66) та CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC (SEQ ID №: 67) або варіант одного або їх обох, та приведення до контакту продуктів ампліфікації з ферментом рестрикції KpnI, причому відсутність розщеплення вказує на те, що ген D гордеїну кодує усічений D гордеїн.

У додатковому аспекті у цьому винаході представлено спосіб запобігання або зменшення частоти виникнення або важкості захворювання целиакією у суб'єкта, причому спосіб включає пероральне введення суб'єкту харчового продукту або напою на основі солоду за цим винаходом або зерна за цим винаходом, при цьому зменшення частоти виникнення або важкості захворювання целиакією порівнюється з тим, коли суб'єкту перорально вводиться така ж кількість відповідного харчового продукту або напою на основі солоду, приготованого із зерна ячменю дикого типу.

Представлено також застосування харчового продукту або напою на основі солоду за цим винаходом або зерна за цим винаходом для виробництва харчового продукту або напою для перорального введення суб'єкту для запобігання або зменшення частоти виникнення або важкості захворювання целиакією.

У додатковому аспекті у цьому винаході представлено спосіб ідентифікації ячмінного зерна, яке може застосовуватися для одержання харчового продукту та/або напою на основі солоду для споживання суб'єктом із захворюванням целиакією, що включає

- а) отримання одного або більше з наступних матеріалів:
 - i) зразка з рослини, здатної продукувати вказане зерно,
 - ii) зерна,
 - iii) солоду, одержаного з цього зерна, та/або

iv) екстракту з вказаного зерна,
 b) проведення аналізу матеріалу з етапу а) для визначення концентрацій В, С та D гордеїнів, пептидів, отриманих з В, С та D гордеїнів, та/або алелів генів В, С та D гордеїнів,
 c) відбір зерна, що містить близько 50 м.ч. або менше гордеїнів, для одержання харчового продукту та/або напою на основі солоду для споживання суб'єктом із захворюванням целиацією.
 У варіанті реалізації винаходу матеріал з етапу а) містить геномну ДНК та на етапі b) включає ідентифікацію наявності або відсутності алелів генів, кодує один або більше або всі 3:

i) В-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 53,
 ii) В-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 54,
 iii) С-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 55, та
 iv) D-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID №: 56,
 причому відсутність алелів виявляє зерно, що містить близько 50 м.ч. або менше гордеїнів.

Будь-який варіант реалізації винаходу повинен прийматися по відношенню будь-якого іншого варіанту реалізації винаходу для здійснення *mutatis mutandis*, якщо тільки спеціально не вказано інше.

Цей винахід не повинен обмежуватися в обсязі спеціальними варіантами реалізації винаходу, які призначені лише для цілей ілюстрації. Функціонально еквівалентні продукти, композиції і способи безумовно знаходяться у межах обсягу винаходу, як описано у цьому документі.

У всьому цьому описі, якщо спеціально не вказано інше або контекстом вимагається протилежне, посилання на один етап, композицію речовин, групу етапів або групу композицій речовин повинно сприйматися як охоплює один елемент або множину (тобто один або більше) з цих етапів, композицій речовин, груп етапів або групу композицій речовин.

Цей винахід у подальшому описується за допомогою наступних не обмежуючих Прикладів та з посиланням на супроводжуючі фігури.

КОРОТКИЙ ОПИС СУПРОВОДЖУЮЧИХ ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Схематичне представлення хромосоми 1 ячменю.

Фігура 2. Відносний кількісний вміст гордеїнів у видах пива. Площа піків вибраних пептидів, що представляють найбільш розповсюджені гордеїни або споріднені поліпептиди, виявлені у пиві (A) QCCCQPLAQISEQAR (SEQ ID №: 5), який представляє авеніноподібний А-білок; (B) VFLQQQCSPVR (SEQ ID №: 53), який представляє В1-гордеїн; (C) VFLQQQCSPVPMPQR (SEQ ID №: 54), який представляє В3-гордеїн; (D) ELQESSLEACR (SEQ ID №: 56), який представляє D-гордеїн, та (E) QCCCQQLANINEQSR (SEQ ID №: 58), який представляє γ -гордеїн-3. Ці репрезентативні пептиди використані для ілюстрації відносної кількості основних білків гордеїнів у видах пива дикого типу (Sloop) та двох видів з делецією гордеїнів, приготованих з сортів Risø 56 та Risø 1508, відповідно, та в 60 комерційних видах пива. Мала площа піка спостерігалася для безглютенових видів пива 17, 47, 49-52, 54 через низький рівень шуму у сигналі, а не через детекцію гордеїну.

Фігура 3. Порівняння амінокислотних послідовностей D гордеїну з сортів Sloop (дикий тип) та Ethiopia R118 (нульовий).

Фігура 4. Порівняння амінокислотних та кодуєчих нуклеотиди послідовностей D гордеїну з сортів Sloop (дикий тип) та Ethiopia R118 (нульовий). Положення праймерів для детекції кожного алеля показано разом з сайтом розщеплення Kpn1, представленим лише у послідовності дикого типу.

Фігура 5. Визначення вмісту гордеїну ліній ULG3.0 методом MRM-MC за площею піку та показуюче відсотковий вміст відносно сорту Sloop (100 %).

Фігура 6. Визначення вмісту гордеїну ліній ULG3.0 методом MRM-MC за площею піку та показуюче відсотковий вміст відносно сорту Sloop (100 %).

Фігура 7. Визначення вмісту гордеїну пива з ULG3.0 методом MRM-MC у вигляді площі піку для визначення певних пептидів. Показані площі піків та відсотковий вміст відносно сорту Sloop (100 %).

Фігура 8. Детекція гордеїнів та гордеїноподібних білків методом MRM-MC у муці з перспективних ліній ULG3.0 (T2-4-8) та ULG3.2, у порівнянні з різновидами дикого типу Sloop, Baudin, Commander та Hindmarsh. На кожному графіку показано середнє значення \pm СО для сумарної площі піків (3 MRM-переходи) для репрезентативного пептиду з кожної родини гордеїнів. У кожному випадку пептид (послідовність, яка вказана на графіку) картується будь-яким з авеніноподібного А-білка, В1-, В3-, С-, D-, γ 1- або γ 3-гордеїну. Номер доступу у базі даних Uniprot приведений у легенді (наприклад, F2EGD5 для першого прикладу).

ВИЗНАЧНИК ДО ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID №№: 1 та 4 – пептиди α -гліадину пшениці.

SEQ ID №№ 2, 3, від 6 до 11, від 16 до 59 та 85 - пептиди гордеїнів ячменю.

SEQ ID №: 5 - авеніноподібний А-пептид пшениці.

SEQ ID №№ від 12 до 15 – пептиди проламінів жита.

5 SEQ ID №№ від 60 до 71 – олігонуклеотидні праймери.

SEQ ID №: 72 – геномна ділянка, що кодує D-гордеїн сорту Sloop ячменю.

SEQ ID №: 73 – геномна ділянка, що кодує D-гордеїн сорту Ethiopia R118 (нульовий).

SEQ ID №: 74 – D-гордеїн сорту Sloop ячменю.

SEQ ID №: 75 – D-гордеїн сорту Ethiopia R118 ячменю.

10 SEQ ID №: 74 – D-гордеїн сорту Sloop ячменю.

SEQ ID №: 75 – D-гордеїн сорту Ethiopia R118 ячменю.

SEQ ID №: 76 – відкрита рамка зчитування, що кодує гордеїн D сорту Sloop ячменю.

SEQ ID №: 77 – відкрита рамка зчитування, що кодує гордеїн D сорту Ethiopia R118 ячменю.

SEQ ID №: 78 – приклад B1-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: Q40020).

15 SEQ ID №: 79 – приклад B3-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: Q4G3S1).

SEQ ID №: 80 – приклад C-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: Q40055).

SEQ ID №: 81 – приклад γ 1-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: P17990).

SEQ ID №: 82 – приклад γ 2-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: Q70IB4).

SEQ ID №: 83 – приклад γ 3-гордеїну ячменю дикого типу (номер доступу: P80198).

20 SEQ ID №: 84 – приклад авеніноподібного А-білку (номер доступу: F2EGD5).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Загальні методики та визначення

25 Якщо спеціально не визначено інше, всі технічні та наукові терміни, використані у цьому документі, повинні прийматися як такі, що мають такі ж значення, які звичайно зрозумілі середньому фахівцю у цій галузі техніки (наприклад, у рослинництві, харчовій технології, культивуванні клітин, молекулярній генетиці, імунології, білковій хімії та біохімії).

30 Якщо не вказано протилежне, методики роботи з рекомбінантним білком, культивування клітин та імунологічні методики, які використовуються у цьому винаході, є стандартними процедурами, добре відомими фахівцям у цій галузі техніки. Такі методики описані та роз'яснені всюди у літературі, у таких джерелах як J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley та Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 та 2, IRL Press (1991), D.M. Glover та B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 та 1996) та F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates та Wiley-Interscience (1988, включаючи всі

35 перевидання до теперішнього часу), Ed Harlow та David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) та J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включаючи всі перевидання до теперішнього часу).

40 Як використовується у цьому документі термін «ячмінь» відноситься до будь-яких видів роду *Hordeum*, включаючи їх попередників, а також їх потомство, отримане схрещуванням з іншими видами. Переважною формою ячменю є вид *Hordeum vulgare*. Зерно більшості сортів ячменю, що вирощують сьогодні у світі у комерційних масштабах, має покриті (з оболонкою) зернівки, в яких так звана оболонка, яка складає зовнішню лему та внутрішню луску, у зрілому стані з'єднана з епідермісом перикарпу. Інші сорти, названі позбавленими оболонки або голозерні

45 ячмені, вільно обмолочуються та оболонки легко видаляються у процесі молотіння. Голозерне ячмінне зерно переважно використовується для споживання людьми, хоча зерно з оболонкою може використовуватися після лущення, оскільки ячмінне зерно з оболонкою переважно використовується для пивоварної промисловості та для годівлі тварин. Ознака позбавленого оболонки зерна контролюється єдиним рецесивним геном, позначеним *nud*, розташованим на

50 довгому плечі хромосоми 7H (Kikuchi et al., 2003).

Захворювання целіакією або глютеніна хвороба являє собою аутоімунне порушення тонкого кишковика, яке зустрічається у генетично схильних індивідів у всіх вікових групах після періоду раннього дитинства. Воно вражає близько 1% індоєвропейської популяції, хоча і у значній мірі рідко діагностується. Захворювання целіакією викликано реакцією на білок гліадин, глютен, виявлений у пшениці (та подібних білках рослин *Triticeae*, які включають інші види, такі як ячмінь та жито). Під дією гліадину фермент тканинна трансглютаміназа модифікує білок, а імунна система переохресно реагує з тканиною кишковика, викликаючи запальну реакцію. Цей процес призводить до сплюснення слизової оболонки тонкого кишковика, яке порушує абсорбцію поживних речовин. Єдиним ефективним методом лікування є безглютенова дієта, що триває

60 все життя. Цей патогенний стан має кілька інших назв, що включають: захворювання *coeliac* (з

лігатурою), спру-целиакія, нетрофічна спру, ендемічна спру, глютеніна ентеропатія або глютензалежна ентеропатія та непереносимість глютену. Симптоми захворювання целиакією у широкому діапазоні відрізняються серед різних людей. Симптоми захворювання целиакією можуть включати один або більше з наступних: утворення газів, періодичне здуття і біль, хронічна діарея, закріп, блідість, неприємний запах або масляний стул, втрата маси/набирання маси тіла, відчуття втоми, анемія невиясненої етіології (низьке число червоних кров'яних клітин, що викликає відчуття втоми), біль у кістках та суглобах, остеопороз, остеопенія, зміна поведінки, відчуття оніміння у ногах (через пошкодження нервів), м'язові судоми, конвульсії, порушення з менструальними циклами (часто через інтенсивну втрату маси), безпліддя, звичне невиношування, затримка росту, зниження набирання маси тіла у грудних дітей, бліді язви на слизовій рота, названі афтозними язвами, знебарвлення зубів або втрата емалі та сверблячий висип на шкірі, названий герпетиформним дерматитом. Деякі з більш частих симптомів включають: втомлюваність, рецидивуючу діарею, біль у животі або судоми, нетравлення, здуття кишечника, здуття живота та втрата маси. Захворювання целиакією може діагностуватися, наприклад, як описано у публікації WO 01/025793.

Як використовується у цьому документі, термін «нульовий алель гена, що кодує D-гордеїн у локусі *Hor3*» відноситься до будь-якого алеля цього локусу, який не кодує білок D-гордеїн або, якщо білок кодується, він не є імуногенним для суб'єкта з захворюванням целиакією (такий як усичений D-гордеїн, представлений на фіг. 3).

Як використовується у цьому документі, термін «відсутність», що використаний у цьому документі у контексті декламованої речовини, означає, що ця речовина видалена із зерна ячменю, або продукту, одержаного з нього, за цим винаходом, або що речовина не виявлена у зерні або продукті за цим винаходом, коли проводяться аналізи на вміст цієї речовини з використанням методу, відомого у цій галузі техніки. Інакше кажучи, речовина може бути присутньою у концентрації, яка недостатня для виявлення, або вона знаходиться у межах стандартної похибки для аналізу на цю речовину. Наприклад, у контексті декламованого гордеїну, термін «відсутність» означає, що специфічний гордеїн не виявляється у аналізі, такому як, наприклад, аналіз MRM-MC, аналіз ІФА або аналіз 2D-гель-електрофорезу, такі як приведені у цьому документі. Речовина, яка відсутня, може бути такою, що не виявляється при проведенні одного виду аналізу або кількох видів аналізів. Необхідно розуміти, що речовина, яка вказана як відсутня у зерні або продукті за цим винаходом, присутня у відповідному зерні або продукті з рослини дикого типу, як легко визначається аналізом, відомим у цій галузі техніки.

Як використовується у цьому документі, термін «гордеїн», наприклад, коли використовується у фразі «близько 50 м.ч. або менше гордеїнів» та подібних фразах, відноситься до загального вмісту гордеїнів, який включає В-, С-, D- та γ-гордеїни.

Терміни «насіння» та «зерно» застосовуються у цьому документі як взаємозамінні. «Зерно» у більшості випадків відноситься до зрілого зібраного зерна, але також може відноситься до зерна після переробки, такої як, наприклад, подрібнення або лущення, коли більшість зерен залишається неушкодженим, або після набухання або пророщування, у відповідності з контекстом. Зріле зерно найчастіше має вміст вологи менше ніж близько 18-20%. Зерно ячменю дикого типу (цільне зерно) у більшості випадків містить 9-12 % білка та близько 30-50 % з нього, як правило 35 %, є протаміном, таким чином, зерно ячменю дикого типу містить за масою близько 3-4 % проламіну. Проламіни виявлені практично виключно в ендоспермі, який складає близько 70% маси цільного зерна.

Як використовується у цьому документі, термін «збиральний індекс» відноситься до маси зібраного зерна та виражається як відсотковий вміст зерна до загальної маси рослини.

Як використовується у цьому документі, термін «відповідна дикому типу» рослина ячменю відноситься до рослини, що містить щонайменше 50 %, переважно щонайменше 75 %, переважніше щонайменше 95 %, переважніше щонайменше 97 %, переважніше щонайменше 99 % та ще переважніше 99,5 % генотипу рослини за цим винаходом, але продукує зерно з немодифікованим вмістом гордеїнів. В одному варіанті реалізації винаходу «відповідна дикому типу» рослина ячменю являє собою сорт, використовуваний в експериментах у рослинництві для впровадження генетичних варіантів, що призводять до зменшеної продукції гордеїнів у зерні. В іншому варіанті реалізації винаходу «відповідна дикому типу» рослина ячменю являє собою вихідний сорт, в який введений трансген, що зменшує продукцію гордеїнів у зерні. У додатковому варіанті реалізації винаходу «відповідна дикому типу» рослина ячменю являє собою сорт, який застосовується на момент подання заявки для комерційного виробництва зерна ячменю, такий як, але не обмежений сортами Bomi, Sloop, Carlsberg II, K8, L1, Vlammingh, Stirling, Hamelin, Schooner, Baudin, Commander, Gairdner, Buloke, WI3586-1747, WI3416, Flagship,

Cowabbie, Franklin, SloopSA, SloopVic, Quasar, VB9104, Grimmatt, Cameo*Arupo 31-04, Prior, Schooner, Unicorn, Harrington, Torrens, Galleon, Morex, Dhow, Capstan, Fleet, Keel, Maritime, Yarra, Dash, Doolup, Fitzgerald, Molloy, Mundah, Oxford, Onslow, Skiff, Unicorn, Yagan, Chebec, Hindmarsh, Chariot, Diamant, Korál, Rubín, Bonus, Zenit, Akcent, Forum, Amulet, Tolar, Heris, Maresi, Landora, Caruso, Miralix, Wikingett Brise, Caruso, Potter, Pasadena, Annabell, Maud, Extract, Saloon, Prestige, Astoria, Elo, Cork, Extract, Laura. У варіанті реалізації винаходу «відповідна дикому типу» рослина ячменю продукує зерно з немодифікованим вмістом гордеїнів, оскільки воно містить повний набір функціональних генів гордеїнів, кодує функціональні білки гордеїни, що включають B, C, D та γ -гордеїни, кодовані локусами Hor2, Hor1, Hor3 та Hor5.

Як використовується у цьому документі термін «один або більше білків зерна ячменю» відноситься до білків, що зустрічаються у природі, які продукуються зерном ячменю, що відрізняються від гордеїнів. Приклади таких білків відомі фахівцям у цій галузі техніки. Спеціальні приклади включають, але не обмежуються, альбумінами ячменю, такими як білок 1 перенесення ліпідів масою 9 кДа (LTP1) (див. Douliez et al. (2000) для огляду та, наприклад, має № доступу бази даних Swiss-prot № P07597), інгібітори α -амілази/трипсину (CMd, CMb, CMa), білок Z (див. Brandt et al. (1990) та номер доступу бази Genbank № P06293) і білки, ідентифіковані у статті Colgrave et al. (2012), включаючи їх процесування (зрілі) форми, а також денатуровані форми та/або їх фрагменти, що утворилися в результаті одержання солоду, муки, цільнозернової крупи, харчового продукту або напою на основі солоду за цим винаходом.

Як використовується у цьому документі, «середню масу зернівки» переважно визначають отриманням щонайменше 25, щонайменше 50 або щонайменше 100, переважніше близько 100, окремих зерен з рослини (або генетично ідентичних рослин, вирощених в однакових умовах) та визначенням середньої маси зерна.

Як використовується у цьому документі, термін «солод» використовується у відношенні ячмінного солоду, «мука» – у відношенні ячмінної муки, «цільнозернова крупа» – у відношенні ячмінної цільнозернової крупи, а «пиво» – у відношенні пива, яке одержано з використанням ячменю, як основного інгредієнта, що забезпечує вуглеводи, які ферментується, за виключенням того, що солод, мука, цільнозернова крупа або пиво явно вказані як такі, що походять з джерела, яке відрізняється від ячменю. Як використовується у цьому документі, «сусло» відноситься до рідини, екстрагованої у процесі затирання під час одержання пива або віскі. Сусло містить цукри, які будуть ферментовані дріжджами, що зброджують, для продукування спирту. Конкретніше, джерело солоду, сусла, муки, пива, цільнозернової крупи, харчового продукту тощо, за цим винаходом одержане при переробці (наприклад, подрібненні та/або ферментації) зерна ячменю. Зерно, солод, сусло, мука, цільнозернова мука або пиво за цим винаходом можуть перемішуватися або змішуватися з зерном, солодом, суслом, мукою, цільнозерною крупою або пивом, які одержані з ячменю. Ці терміни включають солод, сусло, муку, пиво, цільнозернову крупу, харчовий продукт тощо, одержані з суміші зерен, що включає ячмінь. У переважному варіанті реалізації винаходу щонайменше 10% або щонайменше 50% зерна, яке використовується для одержання солоду, сусла, муки, пива, цільнозернової крупи, харчового продукту тощо, є ячмінним зерном.

Термін «рослина», як використовується у цьому документі як іменник, відноситься до цілої рослини, такої як, наприклад, рослини, вирощеної у польових умовах для комерційного виробництва ячменю. «Частина рослини» відноситься до рослинних вегетативних структур (наприклад, листя, стебел), коренів, квіткових органів/структур, насіння (включаючи ембріон, ендосперм та оболонку насіння), рослинної тканини (наприклад, судинна тканина, покривна тканина тощо), клітини, гранули крохмалю або такому ж потомству.

«Трансгенна рослина», «генетично модифікована рослина» або їх варіації відносяться до рослини, яка містить генну конструкцію («трансген»), не виявлену у рослині дикого типу такого ж виду, різновиду або сорту. «Трансген», як відмічено у цьому документі, має звичайне значення у галузі біотехнології та включає генетичну послідовність, яка одержана або змінена за допомогою технології рекомбінантної ДНК або РНК і яка введена до клітини рослини. Трансген може містити генетичну послідовність, отриману з рослинної клітини. Як правило, трансген вводиться до рослини шляхом маніпуляції людини, такої як, наприклад, трансформація, але може бути використаний будь-який спосіб, визнаний фахівцем у цій галузі техніки.

«Молекула нуклеїнової кислоти» відноситься до полінуклеотиду, такому як, наприклад, ДНК, РНК або олігонуклеотиди. Вона може бути ДНК або РНК геномного або синтетичного походження, дволанцюговою або одноланцюговою, та поєднуватися з вуглеводом, ліпідами, білком або іншими речовинами для виконання конкретної дії, визначеної у цьому документі.

Термін «функціонально зв'язаний», як використовується у цьому документі, відноситься до функціонального зв'язка між двома або більше сегментами нуклеїнових кислот (наприклад,

ДНК). Як правило, він відноситься до функціонального зв'язка транскрипційного регуляторного елемента (промотору) з послідовністю, що транскрибується. Наприклад, промотор функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, такою як полінуклеотид, визначений у цьому документі, якщо вона стимулює або модулює транскрипцію кодуючої послідовності у відповідній клітині. У більшості випадків, транскрипційні регуляторні елементи промоторів, які функціонально зв'язані з послідовністю, що транскрибується, фізично розташовані послідовно з послідовністю, що транскрибується, тобто вони є *cis*-діючими. Тим не менш, деякі транскрипційні регуляторні елементи, такі як енхансери, не потребують послідовного фізичного розташування або розташовані у безпосередній близькості з кодуючими послідовностями, транскрипцію яких вони посилюють.

Як використовується у цьому документі, термін «ген» повинен прийматися у своєму самому широкому контексті та включає дезоксирибонуклеотидні послідовності, що містять кодуючу білок ділянку структурного гена та включають послідовності, розташовані по сусідству з кодуючою ділянкою на обох 5'- та 3'-кінцях на відстані щонайменше близько 2 т.н. на будь-якому кінці, який приймає участь в експресії гена. Послідовності, які розташовані на 5'-кінці кодуючої ділянки і які представлені на мРНК, називаються 5'-нетранслюємими послідовностями. Послідовності, які розташовані на 3'-кінці або у прямому напрямку кодуючої ділянки і які представлені на мРНК, називаються 3'-нетранслюємими послідовностями. Термін «ген» охоплює як кДНК так і геномні форми гена. Геномна форма або клон гена містить кодуючу ділянку, яка може перериватися некодуючими послідовностями, названими «інтронами» або «проміжними ділянками» або «проміжними послідовностями». Інтрони представляють собою сегменти гена, які транскрибуються в ядерні РНК (hnRNA); інтрони можуть містити регуляторні елементи, такі як енхансери. Інтрони видаляються або «сплайсуються» з ядерного або первинного транскрипта; тому інтрони відсутні у транскрипті матричної РНК (мРНК). мРНК функціонує під час трансляції для визначення послідовності або порядку амінокислот у поліпептиді, що утворюється. Термін «ген» включає синтетичну або гібридну молекулу, яка кодує всі або частину білків за цим винаходом, описаних у цьому документі, та комплементарну нуклеотидну послідовність до будь-якого з вищевказаних елементів.

Як використовується у цьому документі, термін «інший інгредієнт харчового продукту або напою» відноситься до будь-якої речовини, прийнятної для споживання твариною, переважно будь-якої речовини, прийнятної для споживання людиною, при використанні у вигляді частини харчового продукту або напою. Приклади включають, але не обмежуються, зерном з іншого виду рослин, цукром тощо, але виключають воду.

Рослини за цим винаходом, як правило, мають одну або більше генетичних варіацій, кожна з яких призводить до зменшеного вмісту щонайменше одного гордеїну, переважніше щонайменше В, С та D-гордеїнів. Як використовується у цьому документі, термін «генетична варіація», кожна з яких призводить до зменшеного вмісту щонайменше одного гордеїну, відноситься до будь-якого поліморфізму рослини ячменю, який зменшує продукцію гордеїну. Генетична варіація може містити, наприклад, делецію гордеїнового(их) гена(ів) або його(їх) частини, або мутацію, яка зменшує транскрипцію гена ячменю. Приклади таких генетичних варіацій представлені у лініях Risø 56, Risø 527 і Risø 1508, та Ethiopia R118. З цієї причини, такі рослини можуть використовуватися як вихідні рослини для отримання рослин за цим винаходом. Рослина за цим винаходом може походити з потомства від перехресного схрещування між будь-якими з цих мутантів ячменю. У переважному варіанті реалізації винаходу рослина за цим винаходом не є потомством від перехресного схрещування між лініями Risø 56 та Risø 1508, які містять мутації *hor2* та *lys3*, що присутні у цих лініях, та які є диким типом за геном, що кодує D-гордеїн. У варіанті реалізації винаходу рослина кодує γ 3-гордеїн, що містить амінокислоти, послідовність яких представлена як SEQ ID №: 58, така як γ 3-гордеїн, що містить амінокислоти, послідовність яких представлена як SEQ ID №: 83. Наприклад, рослина може мати функціональний ген γ 3-гордеїну дикого типу, такий як ген γ 3-гордеїну сорту ячменю Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander. У варіанті реалізації винаходу рослина не є потомством від перехресного схрещування між лініями Risø 527 та Risø 1508.

Як використовується у цьому документі, якщо не вказане протилежне, фраза «близько» відноситься до будь-якого обґрунтованого діапазону у світлі значення, що обговорюється. У переважному варіанті реалізації винаходу термін «близько» відноситься до +/-10%, переважніше +/-5%, переважніше +/-1% від значення, що визначається.

Якщо не визначено інше, у відношенні маси та відсоткового вмісту одиницями вимірювання є мас./мас.

Термін «та/або», наприклад, «X та/або Y» повинен розумітися як позначення або «X та Y» або «X або Y» та повинен прийматися як представлення явного підкріплення обох позначень або будь-якого позначення.

У всьому обсязі цього опису слово «включення», або такі варіації як «включає» або «такий, що включає», повинні розумітися як такі, що мають на увазі включення вказаного елементу, цілого числа або етапу, або групи елементів, цілих чисел або етапів, але не виключення будь-якого іншого елементу, цілого числа або етапу, або групи елементів, цілих чисел або етапів.

Проламіни та гордеїни

Проламіни зернових культур (відомі як гліadini у пшениці, гордеїни у ячмені, секаліни у житі, авеніни у вівсі та зеїни у кукурудзі) є основними запасними білками ендосперму у всіх зернах злаків, за виключенням вівса та рису (Shewry та Halford, 2002). Гордеїни представляють 35-50 % від загального вмісту білка в ячмені (Jaradat, 1991). Вони класифіковані за чотирма групами A (також відомими як γ -гордеїн, B, C та D, у порядку зменшення рухливості (Field et al., 1982). B, C, D та γ -гордеїни кодуються локусами Hor2, Hor1, Hor3 та Hor5, відповідно, на хромосомі 1H, яка схематично представлена на фіг. 1.

В гордеїни представляють собою основну білкову фракцію, відрізняються від C гордеїнів за їх вмістом сірки (Kreis та Shewry, 1989). В гордеїни відповідають за 70-80 % загального вмісту, а C гордеїни – за 10-20 % (Davies et al., 1993). A гордеїни у більшості випадків не розглядаються такими, що представляють запасну фракцію, тоді як D гордеїни гомологічні глютенінам з високою молекулярною масою. Гордеїни, разом з рештою споріднених проламінів зернових культур, не експресуються у самому зиготному ембріоні, на відміну від інших запасних білків, таких як напіни; передбачається, що вони експресуються виключно у крохмалистому ендоспермі під час середньопізніх стадій розвитку насіння.

Приклади амінокислотних послідовностей гордеїнів ячменю та кодуючих їх генів представлені у публікації WO 2009/021285.

Осолоджування

Напій на основі солоду, що представлений цим винаходом, охоплює алкогольні напої (включаючи напої, одержані перегонкою) та безалкогольні напої, які одержують з використанням солоду як частини або всієї вихідної сировини. Приклади включають пиво, хапошу (пивний напій з низьким вмістом солоду), віскі, слабоалкогольні напої на основі солоду (наприклад, напої на основі солоду, що містять менше 1 % спирту) та безалкогольні напої.

Осолоджування являє собою процес контрольованого замочування та пророщування з наступним висушуванням зерна ячменю. Ця послідовність перетворень важлива для синтезу багаточисленних ферментів, які викликають модифікацію зерна, процес, який головним чином деполімеризує стінки мертвих клітин ендосперму та мобілізує поживні речовини зерна. У подальшому процесі висушування завдяки хімічним реакціям обсмажування створюється смак, аромат і колір. Не зважаючи на початкове застосування солоду для одержання напоїв, він також може використовуватися для інших промислових процесів, наприклад, як джерело ферментів у хлібопекарній промисловості, або як смакова ароматизуюча речовина або забарвлююча речовина у харчовій промисловості, наприклад, як солод або солодова мука, або опосередковано як солодовий сироп тощо.

В одному варіанті реалізації цей винахід відноситься до способів одержання солодової композиції. Спосіб переважно включає етапи:

- (i) отримання зерна рослини ячменю за винаходом,
- (ii) замочування вказаного зерна,
- (iii) пророщування замочених зерен у попередньо визначених умовах та
- (iv) висушування вказаних пророслих зерен.

Наприклад, солод може вироблятися будь-яким із способів, описаних у виданні Hosenev (Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition, 1994: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.). Тим не менш, будь-який підходящий спосіб одержання солоду також може використовуватися з цим винаходом, такі як способи одержання спеціальних солодів, що включають, але не обмежуються способами обжарювання солоду. Одним не обмежуючим прикладом є описаний у Прикладі 6.

Солод може готуватися лише з використанням зерна, отриманого з рослин ячменю за цим винаходом, або сумішей, які містять інші зерна.

Солод в основному використовується для виробництва пива, але також для виробництва міцних напоїв, одержуваних перегонкою. Виробництво пива включає одержання сусла, основну і вторинну ферментації та витримання. Спочатку солод подрібнюють, замішують з водою та підігрівують. Під час цього «затирання» ферменти, активовані у процесі осолоджування,

руйнують крохмаль зерен до цукрів, що ферментуються. Одержане сусло освітлюють, додають дріжджі, суміш ферментують та проводять витримування.

В іншому варіанті реалізації винаходу композиції сусла можуть готуватися з солоду. Указане сусло може бути первинним та/або вторинним та/або додатковим суслом. Загалом, композиція сусла буде мати високий вміст амінного азоту та вуглеводів, що ферментуються, головним чином мальтози. Як правило, сусло готують інкубуванням солоду з водою, тобто затиранням. Під час затирання композиція солод/вода може доповнюватися додатковими багатими вуглеводами композиціями, наприклад, добавками з ячменю, кукурудзи або рису. Неосолоджені добавки із зернових культур звичайно не містять активних ферментів і, тому, покладаються на ферменти солоду або екзогенні ферменти для забезпечення ферментами, необхідними для конверсії цукрів.

Загалом, першим етапом у процесі одержання сусла є подрібнення солоду для того, щоб вода могла отримати доступ до часток зерна у фазі затирання, яке суттєво впливає на тривалість процесу осолоджування з ферментною деполімеризацією субстратів. Під час затирання подрібнений солод інкубують з рідкою фракцією, такою як вода. Температуру або підтримують постійною (ізотермічне затирання) або поступово підвищують. У будь-якому випадку розчинні речовини, отримані при осолодженні та затиранні, екстрагуються у вказану рідку фракцію перед їх відділенням фільтрацією у сусло, а тверді частки, що залишилися, називаються пивною дробиною. Це сусло також може називатися первинним суслом. Після фільтрації одержують вторинне сусло. Додаткові сусла можуть одержуватися повторенням цієї процедури. Не обмежуючі приклади процедур, що підходять для приготування сусла, описані у виданні Hoseney (вище).

Композиція сусла також може готуватися інкубуванням рослин ячменю за цим винаходом або їх частин з одним або більше підходящих ферментів, таких як ферментні композиції або змішані ферментні композиції, наприклад Ultraflo або Cereflo (Novozymes). Композиція сусла також може готуватися з використанням суміші солоду та неосолоджених рослин ячменю або їх частин, необов'язково доданням одного або більше підходящих ферментів під час вказаного приготування. На додаток до цього, ферменти пролілендопептидаз, які специфічно руйнують токсичні амінозв'язки, що приймають участь у прояві захворювання целиацією, можуть додаватися під час ферментації сусла для зменшення токсичності залишкових гордеїнів (De Angelis et al., 2007; Marti et al., 2005; Stepniak et al., 2006).

Переробка зерна

Зерно ячменю за цим винаходом може перероблятися для одержання харчового інгредієнта, інгредієнта напою, харчового продукту або напою або нехарчового продукту з використанням будь-якої технології, відомої у цій галузі техніки.

В одному варіанті реалізації винаходу продукт являє собою цільнозернову муку (цільнозернова мука надтонкого помелу, така як цільнозернова мука надтонкого помелу; цільнозернова мука або мука, виготовлена на близько 100% із зерна). Цільнозернова мука включає компонент рафінованої муки (рафінованої муки або рафінована мука) та крупну фракцію (крупна фракція надтонкого помелу).

Рафінована мука може бути мукою, яку отримують, наприклад, перемелюванням та просіюванням очищеного ячменю. Управління з контролю харчових продуктів і лікарських засобів (FDA) вимагає, щоб мука відповідала певним стандартам за розміром часток для того, щоб бути включеною до категорії рафінованої муки ячменю. Розмір часток рафінованої муки описує муку, в якій не більше 98% проходить через тканину, що має отвори не більше таких у дротовій тканині, позначеній «212 мікрометрів (стандарт U.S. Wire 70)».

Крупна фракція включає щонайменше один з компонентів: висівки та зародки. Наприклад, зародок являє собою ембріональну рослину, що знаходиться всередині зерна ячменю. Зародок включає ліпіди, волокна, вітаміни, білок, мінеральні речовини та фітонутрієнти, такі як флавоноїди. Висівки включають кілька шарів клітин і мають значну кількість ліпідів, волокон, вітамінів, білка, мінеральних речовин та фітонутрієнтів, таких як флавоноїди. Додатково крупна фракція може включати алейроновий шар, який також включає ліпіди, волокна, вітаміни, білок, мінеральні речовини та фітонутрієнти, такі як флавоноїди. Алейроновий шар, у той самий час технічно вважається частиною ендосперму, проявляє багато тих самих властивостей що й висівки, і тому, як правило, видаляється з висівками і зародком під час процесу подрібнення. Алейроновий шар містить білки, вітаміни та фітонутрієнти, такі як ферулова кислота.

Додатково крупна фракція може змішуватися з компонентом рафінованої муки. Переважно, крупна фракція може гомогенно змішуватися з компонентом рафінованої муки. Гомогенне змішування крупної фракції та компонента рафінованої муки може допомогти у зменшенні розшаруванні часток за розміром при перевезенні. Груба фракція може змішуватися з

компонентом рафінованої муки з утворенням цільнозернової муки, забезпечуючи таким чином одержання цільнозернової муки зі збільшеною поживною цінністю, вмістом волокон і антиоксидантною здатністю у порівнянні з рафінованою мукою. Наприклад, крупна фракція або цільнозернова мука може використовуватися у різних кількостях для заміни рафінованої або

цільнозернової муки у хлібобулочних виробках, закусочних продуктах та харчових продуктах. Цільнозернова мука за цим винаходом (тобто цільнозернова мука надтонкого помелу) також може реалізовуватися безпосередньо споживачам для використання у приготуванні домашніх мучних виробів. У типовому варіанті реалізації винаходу профіль крупності цільнозернової муки такий, що 98% за масою часток цільнозернової муки складає менше 212 мікрметрів.

У додаткових варіантах реалізації винаходу ферменти, що знаходяться всередині висівків та зародків цільнозернової муки та/або крупної фракції інактивуються для того, щоб стабілізувати цільнозернову муку та/або крупну фракцію. Цим винаходом припускається, що інактивовані також може означати інгібовані, денатуровані тощо. Стабілізація являє собою процес, в якому використовується пара, нагрів, радіація або інші види обробки для інактивації ферментів, що знаходяться у шарі висівків або зародків. Ферменти, які зустрічаються у природі у висівках та зародках, будуть каталізувати зміни сполук у муці, несприятливо впливаючи на кулінарні властивості муки та термін придатності. Інактивовані ферменти не каталізують зміни сполук, що знаходяться у муці, тому, мука, яку стабілізували, зберігає свої кулінарні властивості і має більш тривалий термін придатності. Наприклад, у цьому винаході може застосовуватися двопоточна методика подрібнення для перемелювання крупної фракції. Відразу крупна фракція відділяється та стабілізується, потім крупна фракція перемелюється на подрібнювачі, переважно на валковому млині з утворенням крупної фракції, що має розподіл за розмірами часток менших або рівних близько 500 мікрметрів. У типовому варіанті реалізації винаходу окружна швидкість валкового млина звичайно складає між від 115 м/с до 144 м/с, при високій окружній швидкості утворюється тепло. Тепло, що виділяється під час процесу, і потік повітря призводять до зменшення мікробного навантаження крупної фракції. У додаткових варіантах реалізації винаходу перед перемелюванням на валковому млині крупна фракція може мати число аеробних мікроорганізмів при посіві на чашки 95000 колонієутворюючих одиниць/грам (КУО/г), а середнє число коліформ – 1200 КУО/г. Після проходження через валковий млин крупна фракція може мати середнє число аеробних мікроорганізмів при посіві на чашки 10000 КУО/г, а середнє число коліформ – 900 КУО/г. Таким чином, мікробне навантаження може бути помітно зменшене у крупній фракції за цим винаходом. Після просіювання будь-яка перемелена крупна фракція, що має розмір часток більше 500 мікрметрів, може бути повернена у процес для подальшого подрібнення.

У додаткових варіантах реалізації винаходу цільнозернова мука або крупна фракція може бути компонентом харчового продукту. Наприклад, харчовий продукт може бути бубликом, бісквітом, хлібом, булочкою, круасаном, пельменем, англійським кексом, кексом, хлібом піта, квікбредом, охолодженими/замороженими тістовими заготовками, тістом, тушкованою квасолею, буріто, чилі, тако, тамалом, тортілою, закритим пирогом, готовим до споживання зерновим продуктом, готовим до споживання сухим пайком, начинням, їжею для приготування у мікрохвильовій печі, шоколадним тістечком, тістечком, чізкейком, булочкою до кави, печивом, десертом, кондитерським виробом, здобною булочкою, шоколадним батончиком, коржем пирога, начинням пирога, дитячим харчуванням, сумішшю для випічки, млинцевим тістом, паніруванням, сумішшю для підливи, модифікатором м'яса, замінювачем м'яса, сумішшю спецій, суповою сумішшю, підливою, ру, заправкою для салату, супом, сметаною, локшиною, вермішелью, локшиною рамен, локшиною чоу-мейн, локшиною ло-мейн, наповнювачем морозива, брикетом морозива, ріжком морозива, сендвічем морозива, крекером, крутоном, пончиком, яєчним рулетом, формованою закускою, фруктово-зерновим батончиком, закусочним продуктом для приготування у мікрохвильовій печі, поживним батончиком, млинцем, заготовкою хлібобулочного виробу, кренделем, пудингом, продуктом на основі гранолі, закусочним чіпсом, закусочним продуктом, сумішшю для закуски, вафлею, основою для піци, кормом для тварин або кормом для домашніх тварин.

В альтернативних варіантах реалізації винаходу цільнозернова мука або крупна фракція може бути компонентом харчової добавки. Наприклад, харчова добавка може бути продуктом, який додається до дієти, що містить один або більше інгредієнтів, який як правило включає: вітаміни, мінеральні речовини, рослинні добавки, амінокислоти, ферменти, антиоксиданти, рослинні добавки, спеції, пробіотики, екстракти, пребіотики та волокна. Цільнозернова мука або крупна фракція за цим винаходом включає вітаміни, мінеральні речовини, амінокислоти, ферменти та волокна. Наприклад, крупна фракція містить концентровану кількість дієтичних волокон, а також інші незамінні поживні речовини, такі як В-вітаміни, селен, хром, марганець,

магній та антиоксиданти, які незамінні для здорового харчування. Наприклад, 22 грами крупної фракції за цим винаходом забезпечує отримання 33 % рекомендованого індивідуального добового споживання волокон. Додатково, 14 грам дає все необхідне для забезпечення отримання 20 % рекомендованого індивідуального добового споживання волокон. Таким чином, крупна фракція являє собою чудове додаткове джерело для індивідуального споживання волокон. Тому, у цьому варіанті реалізації винаходу цільнозернова мука або крупна фракція може бути компонентом харчової добавки. Харчова добавка може включати будь-які відомі поживні інгредієнти, які будуть покращувати загальне самопочуття індивіда, приклади включають, але не обмежуються вітамінами, мінеральними речовинами, іншими компонентами-волокнами, жирними кислотами, антиоксидантами, амінокислотами, пептидами, білками, лютеїном, рибозою, омега-3 жирними кислотами та/або іншими поживними інгредієнтами.

У додаткових варіантах реалізації винаходу цільнозернова мука або крупна фракція може бути харчовою добавкою волокон або їх компонентом. Багато сучасних добавок волокон, таких як лушпиння подорожника, похідні целюлози та гідролізована гуарова камідь, мають обмежену цінність не враховуючи їх вмісту волокон. На додаток до цього, багато харчових добавок волокон мають неприйнятну текстуру і неприємний смак. Харчові добавки волокон, приготовані з цільнозернової муки або крупної фракції можуть сприяти постачанню волокнами, а також білками та антиоксидантами. Харчова добавка волокон може постачатися, але не обмежуватися наступними формами: сумішами розчинних напоїв, готовими до застосування напоями, поживними батончиками, вафлями, печивом, крекерами, гелевими коктейлями, капсулами, жуйками, жувальними таблетками та пігулками. В одному варіанті реалізації винаходу запропонована харчова добавка волокон у формі ароматизованого коктейлю або напою солодового типу, цей варіант реалізації винаходу може бути особливо привабливими як харчова добавка волокон для дітей.

У додатковому варіанті реалізації винаходу процес подрібнення може використовуватися для одержання багатозернової муки, муки з кількох сортів ячменю або багатозернової крупної фракції. Наприклад, висівки та зародки з одного типу ячменю можуть перемелюватися і змішуватися з перемеленим ендоспермом або цільнозерновою ячмінною мукою ячменю іншого типу. В альтернативному варіанті, висівки та зародки з одного типу ячменю можуть перемелюватися і змішуватися з перемеленим ендоспермом або цільнозерновою мукою зерна іншого типу. У додатковому варіанті реалізації винаходу висівки та зародки з першого типу ячменю або зерна можуть змішуватися з висівками та зародками з іншого типу ячменю або зерна для одержання багатозернової крупної фракції. Припускається, що цей винахід охоплює змішування будь-якої комбінації одного або більше типів висівок, зародків, ендосперму та цільнозернової муки одного або більше типів зерна. Цей підхід з використанням кількох видів зерна, кількох видів ячменю може застосовуватися для одержання оригінальної муки та покращення якісних властивостей і поживного вмісту, використовуючи багато видів зерна або ячменю для одержання однієї муки.

Цільнозернова мука за цим винаходом може виготовлятися за допомогою різноманітних процесів подрібнення. У типовому варіанті реалізації винаходу задіюється перемелювання зерна в одному потоці без розділення ендосперму, висівок та зародків зерна на окремі потоки. Очищене та кондиціоноване зерно подається на подрібнювач першого проходу, такого як молотковий млин, ролерний млин, штифтовий млин, ударний млин, дисковий млин, повітряно-фрикційний млин, валковий млин тощо. В одному варіанті реалізації винаходу подрібнювач може бути валковим млином. Після перемелювання зерно вивантажується та подається на просіювач. Може використовуватися будь-який відомий у цій галузі техніки просіювач для просіювання перемелених часток. Речовина, що проходить через сито просіювача, являє собою цільнозернову муку за цим винаходом та не потребує подальшої переробки. Речовина, що залишається на ситі, називається другою фракцією. Друга фракція вимагає додаткового зменшення розміру часток. Тому, друга фракція може подаватися на подрібнювач другого проходу. Після подрібнення друга фракція може подаватися на другий подрібнювач. Речовина, що проходить крізь сито другого просіювача, являє собою цільнозернову муку за цим винаходом. Речовина, що залишається на ситі, називається четвертою фракцією та вимагає подальшої переробки для зменшення розміру часток. Четверта фракція на ситі другого просіювача подається назад або на подрібнювач першого проходу або подрібнювач другого проходу для подальшої переробки через петлю зворотної подачі. В альтернативному варіанті реалізації винаходу процес може включати багато подрібнювачів першого проходу для забезпечення більшої пропускної здатності системи.

Припускається, що цільнозернова мука, крупна фракція та/або зернопродукти за цим винаходом можуть виготовлятися будь-яким процесом перемелювання, відомим у цій галузі

техніки. Додатково припускається, що цільнозернова мука, крупна фракція та/або зернопродукти за цим винаходом можуть модифікуватися або покращуватися шляхом багаточисельних інших процесів, таких як: ферментація, інстанізація, екструзія, інкапсулювання, піджарювання, обжарювання тощо.

5 Полінуклеотиди, що пригнічують продукцію гордеїну

В одному варіанті реалізації винаходу зерно за цим винаходом та/або те, що використовується у способах за цим винаходом, отримують з трансгенної рослини ячменю, яка містить трансген, що кодує полінуклеотид, який пригнічує в зерні продукцію щонайменше одного гордеїну. Приклади таких полінуклеотидів включають, але не обмежуються, антисмисловим

10 полінуклеотидом, смисловим полінуклеотидом, каталітичним полінуклеотидом, штучною мікроРНК або дуплексною молекулою РНК. Кожний з цих полінуклеотидів, коли він присутній у зерні, призводить до зменшення доступної для трансляції мРНК гордеїну.

Антисмислові полінуклеотиди

Термін «антисмисловий полінуклеотид» повинен застосовуватися у значенні ДНК або РНК, або їх комбінації, молекули, що є комплементарною щонайменше до частини специфічної молекули мРНК, яка кодує гордеїн та здатна взаємодіяти на посттранскрипційну подію, таку як трансляція мРНК. Застосування способів з антисмисловими молекулами добре відомо у цій галузі техніки (див наприклад книгу G Hartmann та S Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)). Застосування методик з антисмисловими молекулами зібрано в оглядах Bourque

20 (1995) та Senior (1998). Автором Senior (1998) вказано, що способи з антисмисловими молекулами у теперішній час є надійно відпрацьованою методикою для маніпулювання генною експресією.

Антисмисловий полінуклеотид в рослині ячменю за цим винаходом буде гібридизувати з цільовим полінуклеотидом у фізіологічних умовах. Як використовується у цьому документі термін «антисмисловий полінуклеотид, що гібридизується у фізіологічних умовах» означає, що полінуклеотид (який повністю або частково одноланцюговий) є щонайменше здатним утворювати дволанцюговий полінуклеотид з мРНК, кодуючою білок, такий як гордеїн ячменю, у клітині ячменю в нормальних умовах.

Антисмислові молекули можуть включати послідовності, які відповідають структурним генам або послідовностям, що здійснюють контроль над генною експресією або подією сплайсингу. Наприклад, антисмислова послідовність може відповідати таргетуемій кодуючій ділянці генів за цим винаходом або 5'-нетранслюємій ділянці (UTR) або 3'-UTR або комбінаціям цих елементів. Вона може бути комплементарною зокрема до інтронних послідовностей, які можуть видалятися сплайсингом під час або після транскрипції, переважно лише до екзонних послідовностей цільового гена. Приймаючи до уваги загальну більшу дивергенцію UTR, таргетування цих ділянок забезпечує більшу специфічність інгібування гена.

Довжина антисмислової послідовності повинна бути рівною щонайменше 19 послідовним нуклеотидам, переважно щонайменше 50 нуклеотидам та переважніше щонайменше 100, 200, 500 або 1000 нуклеотидам. Може використовуватися повнорозмірна послідовність комплементарна цілому генному транс крипту. Найбільш переважною є довжина 100-2000 нуклеотидів. Ступінь ідентичності антисмислової послідовності транскрипта, що таргетується, повинна бути щонайменше 90 % та переважніше 95-100 %. Антисмислова молекула РНК звичайно може містити неспоріднені послідовності, які можуть функціонувати з метою стабілізації молекули.

45 Каталітичні полінуклеотиди

Термін каталітичний полінуклеотид/нуклеїнова кислота відноситься до молекули ДНК або ДНК-місної молекули (також відомої у цій галузі техніки як «дезоксирибозим») або РНК або РНК-місної молекули (також відомої як «рибозим»), яка специфічно розпізнає окремий субстрат та каталізує хімічну модифікацію цього субстрату. Основи нуклеїнових кислот у каталітичній нуклеїновій кислоті можуть бути основами А, С, G, Т (та U для РНК).

Як правило, каталітична нуклеїнова кислота містить антисмислову послідовність для специфічного розпізнавання цільової нуклеїнової кислоти, та нуклеїнову кислоту з розщеплюючою ферментною активністю (також названою у цьому документі як «каталітичний домен»). Типи рибозимів, які особливо придатні до застосування у цьому винаході, являють собою рибозим типу головки молотка (Haseloff та Gerlach, 1988, Perriman et al., 1992) і рибозим типу шпильки (Shippy et al., 1999).

Рибозими рослини ячменю за цим винаходом та кодуєчі ДНК рибозими можуть бути хімічно синтезовані з використанням способів, добре відомих у цій галузі техніки. Рибозими також можуть бути отримані з молекули ДНК (яка при транскрипції дає молекулу РНК) функціонально зв'язану з промотором РНК-полімерази, наприклад, промотором РНК-полімерази T7 або РНК-

полімерази SP6. Коли вектор також містить промотор РНК-полімерази функціонально зв'язаний з молекулою ДНК, то рибозим може продукуватися *in vitro* при інкубації з РНК-полімеразою та нуклеотидами. В окремому варіанті реалізації винаходу ДНК може бути вставлена в експресійну касету або транскрипційну касету. Після синтезу молекула РНК може модифікуватися

лігуванням з молекулою ДНК, що має здатність стабілізувати рибозим і робити його стійким до РНКаз.

Як і з антисмисловими полінуклеотидами, описаними у цьому документі, каталітичні полінуклеотиди також повинні бути здатними до гібридизації з молекулою цільової нуклеїнової кислоти (наприклад, мРНК, кодучій гордеїн ячменю) у «фізіологічних умовах», а саме тих умовах, які притаманні клітині ячменю.

РНК-інтерференція

РНК-інтерференція (RNAi) є особливо підходящим способом для специфічного інгібування продукції конкретного білка. Хоча автори не бажають бути обмеженими конкретною теорією, в статті Waterhouse et al (1998) представлено модель механізму, за допомогою якого дцРНК (дуплексна РНК) може використовуватися для зменшення продукції білка. Ця технологія заснована на присутності молекул дцРНК, які містять послідовність, що є переважно ідентичною мРНК гена, що представляє інтерес, або його частині, у цьому випадку мРНК, яка кодує поліпептид у відповідності з цим винаходом. З метою зручності, дцРНК може продукуватися з єдиного промотору у рекомбінантному векторі або клітині-хазяїні, в якому смислова та антисмислова послідовності фланковані неспорідненими послідовностями, які дають можливість смисловій та антисмисловій послідовностям гібридизуватися з утворенням молекули дцРНК, що утворює з неспорідненою послідовністю петльову структуру. Схема та продукція підходящих молекул дцРНК для цього винаходу узгоджується з можливістю фахівця у цій галузі, особливо приймаючи до уваги публікації Waterhouse et al (1998), Smith et al (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029 та WO 01/34815.

В одному прикладі ДНК вводиться таким чином, що вона направляє синтез щонайменше частково дволанцюгового (дуплексного) продукту(ів) РНК з гомологією до цільового гена, який потрібно інактивувати. Отже, ДНК містить як смислову так і антисмислову послідовності, які, при траскрибуванні в РНК, можуть гібридизуватися з утворенням дволанцюгової ділянки РНК. У переважному варіанті реалізації винаходу смислова і антисмислова послідовності розділені спейсерною ділянкою, яка містить інтрон, що при траскрибуванні в РНК видаляється сплайсингом. Показано, що ця комбінація призводить до більшої ефективності генного сайленсингу. Дволанцюгова ділянка може містити одну або дві молекули РНК, що транскрибуються або з однієї ділянки ДНК або з двох. Припускають, що присутність дволанцюгової молекули запускає відповідь від ендогенної системи рослини, яка руйнує і дволанцюгову РНК, а також гомологічний РНК-транскрипт з цільового гена рослини, ефективно зменшуючи або усуваючи активність цільового гена.

Довжина смислової та антисмислової послідовностей, які гібридизуються, повинна бути рівною кожній щонайменше 19 послідовним нуклеотидам, переважно щонайменше 30 або 50 нуклеотидам та переважніше щонайменше 100, 200, 500 або 1000 нуклеотидам. Може використовуватися повнорозмірна послідовність, що відповідає цілому генному транскрипту. Найбільш переважними є довжини 100-2000 нуклеотидів. Ступінь ідентичності смислової та антисмислової послідовностей транскрипта, що таргетується, повинна бути щонайменше 85 %, переважніше 90 % та переважніше 95-100 %. Молекула РНК звичайно може містити неспоріднені послідовності, які можуть функціонувати з метою стабілізації молекули. Молекула РНК може експресуватися під контролем промотору РНК-полімерази II або РНК-полімерази III. Приклади останніх включають промотор тРНК або мРНК.

Переважні молекули малих інтерферуючих РНК («міРНК») містять нуклеотидну послідовність, яка ідентична близько 19-21 послідовним нуклеотидам у цільовій мРНК. Переважно послідовність цільової мРНК починається з динуклеотиду AA, включає GC-вміст близько 30-70 % (переважно, 30-60 %, переважніше 40-60 % та переважніше близько 45 %-55 %), та не має високого відсотку ідентичності до будь-якої нуклеотидної послідовності, що відрізняється від цільової, у геномі рослини ячменю, в який вона вводиться, наприклад, як визначається стандартним пошуком у програмі BLAST.

МікроРНК

Регуляція за допомогою мікроРНК безсумнівно є спеціалізованим відгалуженням механізму сайленсингу РНК, який залучений у генну регуляцію, відходячи від традиційного механізму RNAi/PTGS. МікроРНК являє собою специфічний клас малих РНК, які закодовані у геноподібних елементах, організованих у характерні інвертовані повтори. При транскрипції гени мікроРНК забезпечують зростання кількості стеблово-петльових попередників РНК, з яких у подальшому

процесуються мікроРНК. МікроРНК, як правило, складаються у довжину з близько 21 нуклеотиду. Вивільнені мікроРНК інкорпорується у RISC-подібні комплекси, що містять конкретний піднабір білков-аргонавтів, які викликають репресію послідовність-специфічних генів (див., наприклад, статті Millar та Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida та Allshire, 2005).

Косупресія

Іншим молекулярно-біологічним підходом, який може використовуватися, є косупресія. Механізм косупресії не є чітко зрозумілим, але припускається, що він залучений до посттранскрипційного сайленсингу генів (PTGS) та, у цьому відношенні, може бути дуже подібним до багатьох прикладів антисмислової супресії. У ньому залучено введення додаткової копії гена або його фрагмента у рослину, у смисловій орієнтації по відношенню до промотору, для його експресії. Розмір смислового фрагмента, його відповідність цільовим генним ділянкам та ступінь його ідентичності послідовності з цільовим геном є такими як для антисмислових послідовностей, описаних вище. У деяких випадках додаткова копія генної послідовності впливає на експресію цільового гена рослини. Для способів здійснення підходів косупресії приводяться посилання на публікації WO 97/20936 та EP 0465572.

Конструкції нуклеїнових кислот

Конструкції нуклеїнових кислот, придатні для отримання трансгенних рослин, можуть легко створюватися з використанням стандартних методик.

При інсерції ділянки, кодуєчої мРНК, конструкція може містити інтронні послідовності. Ці інтронні послідовності можуть сприяти експресії трансгена в рослині. Термін «інтрон» використовується у своєму звичайному смислі у значенні генетичного сегмента, який транскрибується, але не кодує білок, і який видаляється сплайсингом з РНК перед трансляцією. Інтрони можуть вводитися у 5'-UTR або кодуєчу ділянку, якщо трансген кодує продукт, що транслюється, або у будь-яке місце ділянки, що транскрибується, якщо – не кодує. Однак, у переважному варіанті реалізації винаходу будь-яка кодуєча поліпептид ділянка представлена як єдина відкрита рамка зчитування. Фахівець, що отримує завдання, повинен розуміти, що такі відкриті рамки зчитування можуть бути отримані зворотним транскрибуванням мРНК, що кодує поліпептид.

Для забезпечення відповідної експресії гена, який кодує мРНК, що представляє інтерес, конструкція нуклеїнової кислоти, як правило, містить один або більше регуляторних елементів, таких як промотори, енхансери, а також послідовності термінації транскрипції і послідовності поліаденилювання. Такі елементи добре відомі у цій галузі техніки.

Ділянка транскрипційної ініціації, що містить регуляторний(і) елемент(и), може забезпечувати в рослині регульовану або конститутивну експресію. Переважно, експресія щонайменше відбувається у клітинах насіння.

Описаний набір конститутивних промоторів, які активні у рослинних клітинах. Підходящі промотори для конститутивної експресії у рослинах включають, але не обмежуються, промотором 35S вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV), 35S вірусу мозаїки норичнику (FMV), промотором бацилоподібного вірусу цукрової тростини, промотором вірусу жовтої крапчастості комельни, промотором, що індукуюється світлом, з малої субодиниці рибулозо-1,5-біс-фосфаткарбоксилази, промотором цитозольної триозофосфатізомеразису, промотором аденінфосфорибозилтрансферази Arabidopsis, промотором гена актину 1 рису, промоторами манопінсинтази та октопінсинтази, промотором Adh, промотором сахарозосинтази, промотором R-генного комплексу та промотором гена хлорофіл- α/β -зв'язуючого білка. Ці промотори застосовують для створення ДНК-векторів, які експресуються у рослинах; див., наприклад, публікацію WO 84/02913. Усі ці промотори застосовують для створення різних типів рекомбінантних ДНК-векторів, що експресуються у рослинах.

Промотор може модулюватися такими факторами як температура, світло або стресовий вплив. Звичайно, регуляторні елементи будуть знаходитися на 5'-кінці генетичної послідовності, яку потрібно експресувати. Конструкція також може містити інші елементи, які посилюють транскрипцію, такі як ділянки поліаденилювання pos 3' або ocs 3' або термінатори транскрипції.

5'-нетранслюєма лідерна послідовність може бути отримана з промотору, вибраного для експресії гетерологічної генної послідовності та, якщо потрібно, може бути специфічно модифікованою для збільшення трансляції мРНК. Для отримання огляду оптимізації експресії трансгенів, див статтю Koziel et al (1996). 5'-нетранслюємі ділянки також можуть бути отримані з вірусних РНК рослин (серед інших, вірусу тютюнової мозаїки, вірусу гравірування тютюну, вірусу карликової мозаїки кукурудзи, вірусу мозаїки люцерни) з підходящих еукаріотичних генів, генів рослин (лідера гена хлорофіл- α/β -зв'язуючого білка пшениці і кукурудзи) або з синтетичної генної послідовності. Цей винахід не обмежений

використанням конструкцій, в яких ділянка, що не трансклюється, отримана з 5'-нетрансклюємої послідовності, що супроводжує промоторну послідовність. Лідерна послідовність також може бути отримана з неспорідненого промотору або кодуєчої послідовності. Лідерні послідовності, придатні у контексті цього винаходу, включають лідер кукурудзи Hsp70 (US 5362865 та US 5859347) і елемент омега ВТМ.

Термінація транскрипції проводиться 3'-нетрансклюємою послідовністю ДНК, функціонально зв'язаною в химерному векторі з полінуклеотидом, що представляє інтерес 3'-нетрансклюєма ділянка рекомбінантної молекули ДНК містить сигнал поліаденилювання, який функціонує в рослинах, обумовлюючи додавання аденилатних нуклеотидів до 3'-кінця РНК. 3'-нетрансклюєма ділянка може бути отримана з різних генів, які експресуються у клітинах рослин. У зв'язку з цим звичайно використовують 3'-нетрансклюєму ділянку нопалінсинтази, 3'-нетрансклюєму ділянку з малої субодиниці гена рибулозобісфосфаткарбоксилази гороху, 3'-нетрансклюєму ділянку з гена 7S запасного білка насіння сої. Придатні також 3'-транскрибуємі нетрансклюємі ділянки, що містять сигнал поліаденилювання плазмідних генів *Agrobacterium*, що індукують пухлини (Ti).

Як правило, конструкція нуклеїнової кислоти містить маркер, що селектується. Маркери, що селектуються, допомагають при ідентифікації та скринінгу рослин або клітин, яких трансформували молекулою екзогенної нуклеїнової кислоти. Маркерний ген, що селектується, може забезпечувати стійкість до антибіотиків або гербіцидів клітин ячменю або дозволяє засвоювати субстрати, такі як занозу. Маркер, що селектується, переважно надає клітинам ячменю стійкість до пігроміцину.

Переважно, конструкція нуклеїнової кислоти стабільно інкорпорується в геном рослини. Відповідно, нуклеїнова кислота містить підходящі елементи, які дозволяють молекулі інкорпоруватися в геном, або конструкція поміщається у підходящий вектор, який може бути інкорпорований у хромосому клітини рослини.

Один варіант реалізації за цим винаходом включає застосування рекомбінантного вектора, який включає щонайменше трансген, відмічений у цьому документі, вставлений у будь-який вектор, здатний доставляти молекулу нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїна. Такий вектор містить гетерологічні послідовності нуклеїнових кислот, які являють собою послідовності нуклеїнових кислот, що у природі не знаходяться по сусідству з молекулами нуклеїнових кислот за цим винаходом і які переважно походять з видів, що відрізняються від видів, з яких походить(ять) молекула(и) нуклеїнових кислот. Вектор може бути РНК або ДНК, прокаріотичною або еукаріотичною і, як правило, є вірусною або плазмідною.

Набір векторів, підходящих для стабільної трансфекції рослинних клітин або для розробки трансгенних рослин описаний, наприклад, у публікаціях Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp 1987; Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989 та Gelvin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Як правило, експресійні вектори для рослин включають, наприклад, один або більше генів рослин, що клонують під транскрипційним контролем з 5'- та 3'-регуляторних послідовностей, та домінуючий маркер, що селектується. Такі експресійні вектори для рослин також можуть містити промоторну регуляторну ділянку (наприклад, регуляторну ділянку, що контролюється індукційно або конститутивно, регулюється оточуючими умовами або стадіями розвитку, або клітинно- або тканевоспецифічна для експресії), стартовий сайт ініціації транскрипції, зв'язуючий рибосоми сайт, сигнал процесингу РНК, сайт термінації транскрипції та/або сигнал поліаденилювання.

Трансгенні рослини

Трансгенні рослини ячменю, як визначені у контексті цього винаходу включають рослини (а також частини та клітини вказаних рослин) та їх потомство, яке генетично модифіковано з використанням рекомбінантних методик, що обумовлюють продукцію щонайменше одного полінуклеотиду та/або поліпептиду у потрібній рослині або органі рослини. Трансгенні рослини можуть бути отримані з використанням методик, відомих у цій галузі техніки, таких як ті, що загалом описані у публікаціях A Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003) і P Christou та H Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

У переважному варіанті реалізації винаходу трансгенні рослини гомологічні за кожним окремим геном, який був введений (трансген) потомству, не сегрегують за потрібним фенотипом. Трансгенні рослини також можуть бути гетерозиготними за введеним(ими) трансгеном(ами), такими як, наприклад, у потомстві F1, яке вирощується з гібридної рослини. Такі рослини можуть надавати переваги, такі як гібридну життєздатність, добре відомі у цій галузі техніки.

Описано чотири загальних типів способів для прямої доставки гена в клітини: (1) хімічні способи (Graham et al., 1973); (2) фізичні способи, такі як використання мікроін'єкції (Саресчі, 1980); електропорації (див., наприклад, WO 87/06614, US 5472869, 5384253, WO 92/09696 та WO 93/21335) і генної гармати (див., наприклад, US 4945050 та US 5141131); (3) використання вірусних векторів (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis et al., 1988) та (4) використання рецепторопосередкованих механізмів (Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992).

Способи з використанням прискорення, які можуть використовуватися, включають, наприклад, бомбардування мікрочастками та подібні способи. Одним прикладом способу для доставки молекул, що трансформують нуклеїнові кислоти, в рослинні клітини є бомбардування мікрочастками. Цей спосіб розглянутий у статті Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небіологічні частки (мікроснаряди), які можуть покриватися нуклеїновими кислотами та доставлятися в клітини реактивною силою. Типові частки включають частки, що містять вольфрам, золото, платину та подібні речовини. Особлива перевага бомбардування мікрочастками, у доповнення до того, що вона є ефективним способом відтворюваної трансформації однодольних, полягає у тому, що не потребує ні виділення протопластів ні сприйнятливості до інфекції *Agrobacterium*. Ілюстративним варіантом реалізації способу доставки ДНК в клітини *Zea mays* шляхом прискорення є біолістична система доставки α -часток, яка може використовуватися для проштовхування часток, вкритих ДНК, через сито, таке як сито з нержавіючої сталі або матеріалу Nyltex, на поверхні фільтра, вкритого клітинами кукурудзи, які культивують у суспензії. Система доставки часток, що підходить для використання у цьому винаході, являє собою гармату для прискорення гелієм PDS-1000/He, що постачається компанією Bio-Rad Laboratories.

Для бомбардування клітини у суспензії можуть бути сконцентрованими на фільтрах. Фільтри, що містять клітини, які потребують бомбардування, розташовують на підходящій відстані нижче пластины, яка зупиняє мікроснаряди. Якщо потрібно, одне або більше сит також розташовується між гарматою та клітинами, що потребують бомбардування.

В альтернативному варіанті незрілі ембріони або інші клітини-мішені можуть розподілятися на щільному середовищі для культивування. Клітини, що потребують бомбардування, розташовують на підходящій відстані нижче пластины, що зупиняє мікроснаряди. Якщо потрібно, одне або більше сит також розташовують між пристроєм прискорення та клітинами, що потребують бомбардування. Завдяки тому, що застосування методик викладено у цьому документі, хтось може отримати аж до 1000 або більше фокусів клітин, транзійтно експресуючих маркерний ген. Кількість клітин у фокусі, які експресують екзогенний генний продукт через 48 годин після бомбардування, часто знаходиться у діапазоні від однієї до десяти та у середньому складає від однієї до трьох.

При трансформації шляхом бомбардування хтось може оптимізувати умови культивування перед бомбардуванням та параметри бомбардування для виходу максимальних кількостей стабільних трансформантів. У цій технології важливими є як фізичні так і біологічні параметри бомбардування. Фізичні фактори – ті, які супроводжують маніпулювання осадженням ДНК/мікроснарядів, або ті, які впливають на політ та швидкість як макро- так і мікроснарядів. Біологічні фактори включають всі етапи, задіяні при маніпулюванні клітинами перед та безпосередньо після бомбардування, осмотичної корекції клітин-мішеней для допомоги у пом'якшенні травми, пов'язаної з бомбардуванням, а також природа трансформуючої ДНК, такої як лінеаризована ДНК або інтактні суперспіралізовані плазміни. Вважається, що маніпуляції перед бомбардуванням особливо важливі для успішної трансформації незрілих ембріонів.

В іншому альтернативному варіанті реалізації винаходу можуть бути стабільно трансформовані пластиди. Спосіб, що описує трансформацію пластид вищих рослин, включає доставку ДНК з використанням гармати для часток, що містять маркер, який селекується, і таргетуючих ДНК в геном пластид за посередництвом гомологічної рекомбінації (патенти U.S 5451513, U.S 5545818, U.S 5877402, U.S 5932479 та WO 99/05265).

Відповідно, припускається, що хтось може захотіти скоректувати різні аспекти параметрів бомбардування у маломасштабних дослідженнях для повної оптимізації умов. Перш за все, хтось може захотіти скоректувати фізичні параметри, такі як відстань проміжку, відстань польоту, відстань до тканини та тиск гелію. Хтось може також мінімізувати фактори, що зменшують травму шляхом модифікації умов, які впливають на фізіологічний стан клітин-реципієнтів і які, внаслідок цього, впливають на ефективність трансформації та інтеграції. Наприклад, осмотичний стан, гідратація тканин та стадія субкультивування або клітинний цикл клітин-реципієнтів можуть бути скоректовані для оптимальної трансформації. Виконання інших рутинних коректувань стануть відомими фахівцям у цій галузі техніки у світлі цього опису.

Опосередковане бактеріями *Agrobacterium* перенесення є широко використаною системою для введення генів у рослинні клітини, тому що ДНК може бути введення у цілі тканини рослин, тим самим оминаючи потребу у регенерації інтактної рослини з протопласта. Використання опосередкованих *Agrobacterium* інтегруючих векторів рослин для введення ДНК у

рослинні клітини добре відомо у цій галузі техніки (див., наприклад, патенти US 5177010, US 5104310, US 5004863, US 5159135). Додатково, інтеграція Т-ДНК є відносно точним процесом, що призводить до незначних перебудов. Ділянка ДНК, яку потрібно перенести, визначається граничними послідовностями, а проміжна ДНК звичайно вставляється в геном рослини.

Сучасні трансформаційні вектори *Agrobacterium* здатні до реплікації в *E. coli*, також як в *Agrobacterium*, дозволяючи виконувати зручні маніпуляції, як описано авторами (Klee et al., B: Plant DNA Infectious Agents, Hohn та Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp 179-203 (1985). Більш того, технологічний прогрес щодо векторів для опосередкованого *Agrobacterium* перенесення генів покращив упорядкування генів і сайтів рестрикції у векторах для полегшення конструювання векторів, здатних експресувати різні кодуючі поліпептиди гени. Описані вектори мають зручні мультилінкерні ділянки, фланковані промотором та сайтом поліаденилювання для прямої експресії генів, які вставляють, кодуючих поліпептиди, та є підходящими для цілей цього винаходу. На додаток до цього, для трансформацій можуть використовуватися *Agrobacterium*, що містять Ті-гени як наділені плечима так і не наділені плечима. У таких різновидах рослин, в яких ефективна опосередкована *Agrobacterium* трансформація, це є переважним способом через визначену природу перенесення генів, яка легко піддається впливу.

Трансгенна рослина, утворена при використанні трансформаційних способів з *Agrobacterium*, як правило, містить єдиний генетичний локус на одній хромосомі. З такими трансгенними рослинами можуть поступати як з гемізиготними за доданим геном. Переважно використовувати трансгенну рослину, яка гомозиготна за доданим структурним геном; тобто трансгенну рослину, яка містить два доданих гена, по одному гену в однаковому локусі на кожній хромосомі хромосомної пари. Гомозиготна трансгенна рослина може бути отримана шляхом статевого схрещування (самозапилення) незалежної сегрегантної трансгенної рослини, яка містить єдиний доданий ген, пророщуванням кількох насінин, отриманих і проаналізованих результуючих рослин на предмет вмісту гена, що представляє інтерес.

Повинно також бути зрозумілим, що дві різні трансгенні рослини також можуть схрещуватися для отримання потомства, яке містить два незалежно сегрегуючих екзогенних генів. Самозапилення відповідного потомства може створити рослини, які гомозиготні за обома екзогенними генами. Мається на увазі також зворотне схрещування вихідної рослини та неспоріднене схрещування з нетрансгенною рослиною, так само як і вегетативне розмноження. Опис інших способів розведення, які звичайно використовуються для отримання різних ознак і культур, можуть бути знайдені у автора Fehr, у: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J ed., American Society of Agronomy, Madison Wis (1987).

Трансформація протопластів рослин може бути досягнута з використанням способів, заснованих на осадженні фосфату кальцію, обробці поліетиленгліколем, електропорації та комбінаціями цих обробок. Використання цих систем до різних різновидів рослин залежить від здатності регенерувати такий конкретний рослинний штам з протопластів. Описані ілюстративні способи для регенерації зернових культур з протопластів (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

Можуть також використовуватися інші способи трансформації клітин та включати, але не обмежуватися введенням ДНК у рослини прямим перенесенням ДНК у пиллоку, прямою ін'єкцією ДНК у репродуктивні органи рослини або прямою ін'єкцією ДНК у клітини незрілих ембріонів після регідратації висушених ембріонів

Регенерація, розвиток та культивування рослин з протопластів-трансформантів єдиної рослини або з різних трансформованих експлантатів добре відомі у цій галузі техніки (Weissbach et al., в: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Цей процес регенерації і росту, як правило, включає етапи відбору трансформованих клітин, культивування цих індивідуалізованих клітин за посередництвом звичайних стадій ембріонального розвитку через стадію вкорінення ростків. Трансгенні ембріони та насіння регенерують подібним чином. Після цього отримані в результаті трансгенні вкорінені паростки вирощують у підходящому середовищі для вирощування рослин, такому як ґрунт.

Розвиток або регенерація рослин, що містять чужерідний екзогенний ген, добре відомі у цій галузі техніки. Переважно, регенеровані рослини є самозапилюючими, що забезпечує отримання трансгенних рослин. У протилежному випадку, пиллоку з регенерованих рослин схрещують з вирощеними з насіння рослинами агрономічно значимих ліній. І навпаки, пиллоку з рослин цих значимих ліній використовують для опилення регенерованих рослин. Трансгенна

рослина за цим винаходом, що містить потрібну екзогенну нуклеїнову кислоту, культивується з використанням способів добре відомих фахівцю у цій галузі техніки.

Способи трансформування дводольних, головним чином з використанням бактерій *Agrobacterium tumefaciens*, та отримання трансгенних рослин опубліковано для бавовни (U.S 5004863, U.S 5159135, U.S 5518908); сої (U.S 5569834, U.S 5416011); капусти (U.S 5463174); арахісу (Cheng et al., 1996) та гороху (Grant et al., 1995).

Способи трансформації зернових рослин, таких як ячмінь для введення генетичної варіації у рослині введенням екзогенної нуклеїнової кислоти та для регенерації рослин з протопластів або незрілих ембріонів рослин добре відомі у цій галузі техніки, див наприклад, патенти CA 2092588, AU 61781/94, AU 667939, US 6100447, PCT/US97/10621, US 5589617, US 6541257 та WO 99/14314. Переважно, трансгенні рослини ячменю отримують шляхом опосередкованих *Agrobacterium tumefaciens* трансформаційних процедур. Вектори, що несуть потрібну конструкцію нуклеїнової кислоти, можуть вводитися у клітини ячменю, що регенеруються, тканини рослин, що культивуються, або експлантати, або у підходящі рослинні системи, такі як протопласти.

Клітини ячменю, що регенеруються, переважно виділяють з щитка незрілих ембріонів, зрілих ембріонів, отриманого з них калусу або меристематичної тканини.

Для підтвердження наявності трансгенів у трансгенних клітинах і рослинах, може проводитися ампліфікація полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) або аналіз Саузерн-блотингу, використовуючи методи, відомі фахівцям у цій галузі техніки. Продукти експресії трансгенів можуть детектуватися будь-яким з різноманітних способів, у залежності від природи продукту і включають вестерн-блотинг та ферментний аналіз. Один особливо підходящий спосіб кількісного визначення експресії білків та детекції реплікації у різних тканинах рослин являє собою використання репортерного гена, такого як GUS. Як тільки отримують трансгенні рослини, вони можуть вирощуватися для отримання тканин або частин рослин, які мають потрібний фенотип. Можуть бути заготовлені тканини рослин або частини рослин та/або зібране насіння. Насіння може служити джерелом для вирощування додаткових рослин з тканинами або частинами, які мають потрібні властивості.

Отримання мутантних рослин

Існує багато методик, відомих у цій галузі техніки, які можуть використовуватися для отримання ячменю зі зменшеним вмістом гордеїнів методом мутування ендегенних генів гордеїнів, які включають без обмеження, метод TILLING, використання цинк-пальцевої нуклеази, TAL-ефекторної нуклеази (TALEN) та коротких паліндромних повторів, регулярно розташованих групами (CRSPR).

TILLING

Рослини за цим винаходом можуть отримувати з використанням процесу, відомого як TILLING (індуковані таргетингом локальні порушення у геномах). На першому етапі отримують введенні мутації, такі як індуковані у популяції рослин зміни, що раніше не існували, в одній парі основ шляхом обробки насіння (або пилку) хімічним мутагеном, та потім розводять рослини до отримання генерації, в якій мутації будуть стабільно успадковуватися ДНК виділяють і збирають насіння від усіх представників популяції для створення джерела, до якого можна повторно отримувати доступ протягом тривалого часу.

Для аналізу TILLING, розроблені ПЛР-праймери для специфічної ампліфікації єдиного гена-мішені, що представляє інтерес. Специфічність особливо важлива, якщо мішень є представником родини генів або частиною поліплоїдного генома. Далі, для ампліфікації ПЛР-продуктів з об'єднаної ДНК з багатьох окремих рослин можуть застосовуватися мічені барвником праймери. Ці ПЛР-продукти денатурують та вторинно відпалюють так, щоб дати можливість утворюватися некомплементарним парам основ. Міснатчі або гетеродуплекси, обидва представляють типи одонуклеотидного поліморфізму (ОНП), що зустрічаються у природі (тобто кілька рослин з популяції з ймовірністю несуть такий поліморфізм), так і індуковані ОНП (тобто лише поодинокі окремі рослини з ймовірністю проявляють мутацію). Після утворення гетеродуплекса ключовим моментом для виявлення ОНП, що раніше не існували, у межах популяції після використання методу TILLING є застосування ендонуклеази, такої як Cel I, яка розпізнає і розщеплює некомплементарну ДНК.

З використанням цього підходу можуть проходити скринінг тисячі рослин для ідентифікації будь-якої окремої одонуклеотидної зміни, а також малих інсерцій і делецій (1-30 п.н.) у будь-якому гені або специфічній ділянці генома. Геномні фрагменти, що аналізують, можуть знаходитися у діапазоні будь-якого розміру від 0,3 до 1,6 т.н. При 8-кратному об'єднанні визначають фрагменти розміром 1,4 т.н (ігноруючи кінці фрагментів, де детекція ОНП проблематична через шум) та 96 доріжок за один аналіз, ця комбінація дозволяє проводити

скринінг аж до мільйону пар основ геномної ДНК у єдиному аналізі, що робить TILLING високопродуктивною методикою.

Метод TILLING додатково описаний у статтях Slade та Knauf (2005) і Henikoff et al., (2004).

На додаток до цього, цей метод дозволяє ефективно детектувати мутації, високопродуктивна технологія TILLING є ідеальною для детекції природних типів поліморфізму. Отже, детальне дослідження невідомої гомологічної ДНК шляхом утворення гетеродуплексів з відомою послідовністю виявляє кількість та положення поліморфних сайтів. Ідентифікують як нуклеотидні зміни так і малі інсерції і делеції, що включають щонайменше деяку кількість типів поліморфізму, що повторюється. Цей процес був названий Ecotilling (Comai et al., 2004).

Кожний тип ОНП записується за його приблизним положенням у межах кількох нуклеотидів. Таким чином, може бути досягнуто визначення кожного гаплотипу на основі його мобільності. Дані щодо послідовностей можуть бути отримані з відносно малими поступово зростаючими затратами з використанням аліквот таких самих ампліфікованих ДНК, які використовуються для аналізу з місматч-розщепленням. Лівий або правий праймер для секвенування для єдиної реакції вибирають за його наближенням до поліморфізму. Програмне забезпечення секвенсера виконує множинне вирівнювання та виявляє зміну основ, яка у кожному випадку підтверджується полосами у гелі.

Метод Ecotilling може виконуватися з меншими затратами, ніж повне секвенування, у теперішній час цей метод використовується у більшості досліджень ОНП. Планшети, що містять упорядковані екотипові ДНК, можуть проходити скринінг простіше, ніж об'єднання ДНК з рослин, що мутували. Через те, що детекція проводиться на гелях з розрізненням майже до пари основ, а фонові патерни однорідні серед доріжок, то можуть співпадати полоси, які мають ідентичний розмір, таким чином виявлення і генотипування ОНП проходить за один етап. Отже, більш детальне секвенування за ОНП є простим і ефективним та досягає фактично більшого, ніж використання аліквот таких самих ПЛР-продуктів, що застосовуються для скринінгу, які можуть бути предметом ДНК-секвенування.

Редагування генома з використанням сайт-специфічних нуклеаз

При редагуванні генома застосовуються сконструйовані нуклеази, що містять послідовності специфічних доменів, що зв'язують ДНК, гібридизовані з неспецифічним модулем, що розщеплює ДНК. Ці химерні нуклеази здатні створювати ефективні і точні генетичні модифікації індукуванням направлених розривів дволанцюгової ДНК, які стимулюють механізми клітини з репарації ендегенної клітинної ДНК для репарації індукованого розриву. Такі механізми включають, наприклад, негомологічне з'єднання кінців, що допускає помилки (NHEJ), та гомологічно направлену репарацію (HDR).

У присутності плазміди-донора з додатковими гомологічними плечима, HDR може приводити до введення одного або багатьох трансгенів для корекції або заміни існуючих генів. У відсутності плазміди-донора NHEJ-опосередкована репарація залишає малі інсерційні та делеційні мутації мішені, які викликають руйнування гена.

Сконструйовані нуклеази придатні для способів за цим винаходом включають цинк-пальцеві нуклеази (ZFN) та подібні активатору транскрипції (TAL) ефекторні нуклеази (TALEN).

Як правило, нуклеази, які кодують гени, доставляються у клітини плазмідними ДНК, вірусними векторами або мРНК, що транскрибуються *in vitro*. Використання флуоресцентних сурогатних репортерних векторів також дозволяє проводити збагачення ZFN- та TALEN-модифіковані клітини. Як альтернатива системам доставки ZFN-генів, клітини можуть контактувати з очищеними ZFN-білками, які здатні перетинати клітинні мембрани та індукувати руйнування ендегенних генів.

Складні геноми часто містять багато копій послідовностей, які ідентичні або найвищою мірою гомологічні з ймовірною ДНК-мішенню, що потенційно призводить до нецільової активності та клітинної токсичності. Для вирішення цього питання може використовуватися структура (Miller et al., 2007; Szczepek et al., 2007) та засновані на відборі підходи (Doyon et al., 2011; Guo et al., 2010) для створення покращених гетеродимерів ZFN та TALEN з оптимізованою специфічністю розщеплення та зменшеною токсичністю.

Цинк-пальцева нуклеаза (ZFN) містить ДНК-зв'язуючий домен та ДНК-розщеплюючий домен, причому ДНК-зв'язуючий домен містить щонайменше один цинковий палець та функціонально зв'язаний з ДНК-розщеплюючим доменом. Цинк-пальцевий ДНК-зв'язуючий домен знаходиться на N-кінці білка, а ДНК-розщеплюючий домен розміщений на C-кінці вказаного білка.

ZFN повинна мати щонайменше один цинковий палець. У переважному варіанті реалізації винаходу ZFN повинна мати щонайменше три цинкових пальця для того, щоб мати достатню специфічність, щоб бути придатною для направленої генетичної рекомбінації у клітині-хазяїні

або організмі. Як правило, ZFN, яка має більше трьох цинкових пальців, повинна мати пропорційно більшу специфічність з кожним додатковим цинковим пальцем.

Цинк-пальцевий домен може походити з будь-якого класу або типу цинкового пальця. У конкретному варіанті реалізації винаходу цинк-пальцевий домен містить цинковий палець типу *Cis₂His₂*, який широко представлений у більшості випадків, наприклад, у цинк-пальцевих факторах транскрипції TFIIIA або Sp1. У переважному варіанті реалізації винаходу цинк-пальцевий домен містить три цинкових пальця типу *Cis₂His₂*. Розпізнавання ДНК та/або специфічність зв'язування ZFN може бути змінена для того, щоб провести направлену генетичну рекомбінацію у будь-якому вибраному сайті у клітинній ДНК. Такі модифікації можуть виконуватися з використанням відомих молекулярно-біологічних та хімічних методик синтезу (див., наприклад, статтю Bibikova et al., 2002).

ДНК-розщеплюючий домен ZFN отримують з класу неспецифічних ДНК-розщеплюючих доменів, наприклад, ДНК-розщеплюючий домен ферменту рестрикції II типу, такого як FokI (Kim et al., 1996). Інші підходящі ендонуклеази можуть включати, наприклад, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI та AlwI.

Лінкер, якщо він присутній між розщеплюючим і розпізнаючим доменами ZFN, містить послідовність амінокислотних залишків, вибраних таким чином, щоб результуючий лінкер був гнучким. Або, для максимальної специфічності до цільового сайту, створюють безлінкерну конструкцію. Безлінкерна конструкція має сильну перевагу для зв'язування та наступного розщеплення між сайтами розпізнавання, які знаходяться на відстані 6 п.н. Тим не менш, для довжин лінкерів між 0 та 18 амінокислотами у довжину ZFN-опосередковане розщеплення відбувається між сайтами розпізнавання, які знаходяться на відстані між 5 та 35 п.н. Для даної довжини лінкерів буде існувати межа відстані між сайтами розпізнавання, яка узгоджується як зі зв'язуванням так і з димеризацією (Bibikova et al., 2001). У переважному варіанті реалізації винаходу відсутній лінкер між розщеплюючим і розпізнаючим доменами, а цільовий локус містить сайти розпізнавання з двох-дев'яти нуклеотидів у зворотній орієнтації по відношенню один до одного, розділені спейсером з шести нуклеотидів.

Для того, щоб направити генетичну рекомбінацію або мутацію у відповідності з переважним варіантом реалізації за цим винаходом у хазяїнській ДНК повинні бути ідентифіковані дві послідовності, що розпізнають ДНК, з цинковим пальцем з 9 п.н. Ці сайти розпізнавання повинні знаходитися в інвертированій орієнтації по відношенню один до одного та розділені близько 6 п.н. ДНК Потім створюють ZFN розробкою та отриманням комбінацій цинкових пальців, які специфічно зв'язують ДНК у цільовому локусі, а потім зв'язуючи цинкові пальці з ДНК-розщеплюючим доменом.

Активність ZFN може бути покращена за посередництвом застосування транзйентних гіпотермічних умов культивування для збільшення рівнів експресії нуклеаз (Doyon et al., 2010) та спільною доставкою сайт-специфічних нуклеаз з ферментами, що процесуються на кінцях ДНК (Certo et al., 2012). Специфічність ZFN-опосередкованого редагування генома може бути покращена використанням цинк-пальцевих ніказ (ZFN-ніказ), які стимулюють HDR без активації механізму репарації, що допускає помилки NHE-J (Kim et al., 2012; Wang et al., 2012; Ramirez et al., 2012; McConnell Smith et al., 2009).

Подібна активатору транскрипції (TAL) ефекторна нуклеаза (TALEN) містить TAL-ефекторний ДНК-зв'язуючий домен та ендонуклеазний домен.

TAL-ефектори представляють собою білки патогенних для рослин бактерій, які ін'єктуються патогеном у рослинну клітину, в якій вони переміщуються в ядро та функціонують як фактори транскрипції, активуючі специфічні гени рослин. Первинна амінокислотна послідовність TAL-ефектору обумовлює нуклеотидну послідовність з якою вона зв'язується. Таким чином, цільові сайти можуть бути передбачені для TAL-ефекторів, а TAL-ефектори можуть конструюватися та створюватися з метою зв'язування з конкретними нуклеотидними послідовностями.

Гібридизовані з послідовностями нуклеїнових кислот, що кодують TAL-ефектори, представляють собою послідовності, які кодують нуклеазу або частину нуклеази, як правило, неспецифічний розщеплюючий домен ендонуклеази рестрикції II типу, такий як FokI (Kim et al., 1996). Інші підходящі ендонуклеази можуть включати, наприклад, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI та AlwI. Той факт, що деякі ендонуклеази (наприклад, FokI) функціонують лише у вигляді димерів, може бути використаним для посилення цільової специфічності TAL-ефектору. Наприклад, у деяких випадках кожний мономер FokI може гібридизуватися з TAL-ефекторною послідовністю, яка розпізнає різні послідовності ДНК-мішеней, та коли лише два сайти розпізнавання знаходяться у безпосередній близькості, приводить неактивні мономери до об'єднання для утворення функціонального ферменту. Якщо потрібне зв'язування ДНК для активації нуклеази може бути створений високоактивний сайт-специфічний фермент рестрикції.

Послідовність-специфічна TALEN може розпізнавати конкретну послідовність у попередньо вибраній цільовій нуклеотидній послідовності, що присутня в клітині. Таким чином, у деяких варіантах реалізації винаходу цільова нуклеотидна послідовність може скануватися на наявність сайтів розпізнавання нуклеаз, та на основі цільової послідовності може вибиратися конкретна нуклеаза. В інших випадках TALEN може конструюватися для таргетування конкретної клітинної послідовності.

Редагування генома з використанням програмованих РНК-направляємих ДНК-ендонуклеаз

Система з використанням коротких паліндромних повторів, регулярно розташованих групами (CRISPR)/Cas, яка відрізняється від сайт-специфічних нуклеаз, описаних вище, є альтернативою ZFN та TALEN в індукуванні направлених генетичних змін. У бактеріях система CRISPR забезпечує набутий імунітет проти проникнення чужорідної ДНК за посередництвом РНК-направленого розщеплення ДНК.

Системи CRISPR засновані на CRISPR РНК (crRNA) та транскрипційній РНК (tracrRNA) для послідовність-специфічного сайленсingu проникаючої чужорідної ДНК. Існує три типи систем CRISPR/Cas: у системах II типу Cas9 служить РНК-направляємою ДНК-ендонуклеазою, яка розщеплює ДНК при направленому розпізнаванні crRNA-tracrRNA. Основи CRISPR РНК спарюються з tracrRNA з утворенням подвійної РНК-структури, яка направляє ендонуклеазу Cas9 до комплементарних сайтів ДНК для розщеплення.

Система CRISPR може переноситися у рослинні клітини спільною доставкою плазмід, що експресують ендонуклеазу Cas та необхідні компоненти crRNA. Ендонуклеаза Cas може перетворюватися у ніказу для забезпечення додаткового контролю над механізмом репарації ДНК (Cong et al., 2013).

Локуси CRISPR є відмінним класом коротких повторів послідовностей (SSR), що перемежуються, які спочатку були розпізнані у *E. coli* (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989). Подібні SSR, що перемежуються, були ідентифіковані у бактеріях *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* та *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993; Hoe et al., 1999; Masepohl et al., 1996; Mojica et al., 1995).

Локуси CRISPR відрізняються від інших SSR структурою повторів, які були названі короткими регулярно розділеними повторами (SRSR) (Janssen et al., 2002; Mojica et al., 2000). Повтори представляють собою короткі елементи, які зустрічаються у кластерах, що завжди регулярно розділені проміжними послідовностями постійної довжини (Mojica et al., 2000). Хоча послідовності, що повторюються, є висококонсервативними серед штамів, кількість повторів, що перемежуються, та послідовностей спейсерних ділянок відрізняється від штаму до штаму (van Embden et al., 2000).

Звичайні структурні властивості локусів CRISPR описані у статті Jansen et al., (2002) такі як (i) присутність багатьох коротких прямих повторів, які не показують або проявляють дуже малу варіацію послідовностей у межах даного локусу; (ii) присутність спейсерних послідовностей, що не повторюються, між повторами подібного розміру; (iii) присутність звичайної лідерної послідовності з кількох сотень пар основ у більшості видів, які містять багато локусів CRISPR; (iv) відсутність довгих відкритих рамок зчитування всередині локусу та (v) присутність одного або більше генів cas.

Як правило, CRISPR представляють собою короткі частково паліндромні послідовності з 24-40 п.н., що містять внутрішні та кінцеві обернені повтори розміром аж до 11 п.н. Хоча були детектовані ізольовані елементи, у більшості випадків вони упорядковані у кластери з аж до 20 або більше на геном) одиниць, що повторюються, розділених унікальними послідовностями, що перемежуються, з 20-58 п.н. У більшості випадків CRISPR гомогенні всередині даного геному, більшість з них є ідентичними. Тим не менш, існують приклади гетерогенності, наприклад, у статті Archaea (Mojica et al., 2000).

Як використовується у цьому документі термін «ген cas» відноситься до одного або більше генів cas, які у більшості випадків зчеплено асоційовані або близько розташовані або знаходяться по сусідству з фланкованими CRISPR локусами. Вичерпний огляд родини білків Cas представлений у статті Haft et al (2005). Кількість генів cas у цьому локусі CRISPR серед видів може сильно варіювати.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1 Матеріали та методи
Рослинний матеріал

Лінія ячменю сорту Sloop (дикий тип) отримана з австралійської колекції озимих зернових культур (м Темворт, Австралія). Лінії Risø 56 (не експресуюча В-гордеїни) та Risø 1508 (не експресуюча С-гордеїни та експресуюча меншу кількість D- та В-гордеїнів) (Doll, 1973; Doll, 1983) отримані зі скандинавського банку зародкової плазми (м Алнарп, Швеція). Лінія Risø 1508

є індукованим етиленіміном мутантом, що несе мутацію у гені *lys3a* на хромосомі 5H, яка зменшує накопичення С-гордеїнів. Кожна з цих ліній є загальнодоступною. Рослини вирощували в умовах теплиці при 25 °С вдень та 20 °С вночі, а зібране насіння перевіряли, щоб виключити контамінацію. Для експериментів по осолодженню та варінню пива рослини сортів Sloop, Risø 56 та Risø 1508 вирощували поруч у польових умовах на дослідній станції CSIRO Гініндера, м Канбера, та зібрали по 10 кг зерна кожного сорту. Зерно осолоджували та варили партії по 20 л пива з використанням стандартних методик.

Екстракція проламінів з муки

Для екстракції проламінів (спирторозчинних білків) перемелювали зерно у цільнозернову муку з використанням стандартних методик. Проламіни з промитої водою цільнозернової муки (10 г) розчиняли у розчині 55 % (об./об.) пропан-2-олу (ступінь чистоти для ВЕРХ), 2 % (мас./об.) дитіотреїтолу (ДТТ) інкубацією при 65 °С протягом 45 хв та осаджували двома об'ємами пропан-2-олу при -20 °С протягом ночі. Осаджені проламіни розчиняли у розчині 8 М сечовини, 1 % ДТТ, 25 мМ триетаноламіну-НCl (рН 6) та очищували рідинною експрес-хроматографією білків (FPLC) на колонці Resource RPC об'ємом 4 мл (GE Healthcare, м Сідней, НПУ, Австралія) елюванням 30 мл лінійного градієнту (при 2 мл/хв) від 3 до 60 % ацетонітрилу з 1 % (об./об.) трифтороцтової кислоти (ТФО).

Метод підготовки зразків з використанням фільтрації (FASP)

П'ятдесят мкл екстракту гордеїнів переносили на фільтр PALL Nanosep з номінальним відсіканням за молекулярною масою (NBMM) 10 кДа. Додавали 200 мкл 8 М сечовини (Sigma) у 0,1 М трис/НCl рН 8,5 (розчин UA) і отриману суміш центрифугували при 14000 об/хв протягом 15 хв при близько 20 °С. Фільтрат з пробірки відкидали. До фільтруючого елементу додатково додавали 200 мкл розчину UA та повторно центрифугували при 14000 об/хв протягом 15 хв. Додавали 100 мкл розчину IAA (0,05 М йодацетаміду в UA) та зразок змішували при 600 об/хв у термозмішувачі установленому на 20 °С протягом 1 хв, а потім інкубували без перемішування протягом 20 хв. До фільтруючого елементу додавали 100 мкл розчину UA і центрифугували при 14000 об/хв протягом 15 хв. Цей етап повторювали двічі. До фільтруючого елементу додавали 100 мкл 0,05 М NH₄HCO₃ (бікарбонат амонію, розчин ABC) у воді та центрифугували при 14000 об/хв протягом 10 хв. Цей етап повторювали двічі. Додавали 40 мкл розчину ABC з 15 мкл маточного розчину трипсину (1,5 мкг/мкл, Sigma) і кожний зразок змішували при 600 об/хв у термозмішувачі протягом 1 хв. Фільтруючі елементи інкубували у вологій камері при 37 °С протягом 4-18 год для проходження ферментативного розщеплення. Фільтруючі елементи переносили у новий набір пробірок та центрифугували при 14000 об/хв протягом 10 хв. Додавали 40 мкл розчину ABC та фільтруючі елементи центрифугували при 14000 об/хв протягом 10 хв. Цей етап повторювали двічі. Фракцію фільтрату підкислювали додаванням 15 мкл 5 % мурашиної кислоти та ліофілізували. Екстраговані висушені пептиди ресуспендували у 30 мкл 0,5 % мурашиної кислоти для проведення аналізу методом MRM.

Одержання сусла і пива

Ячмінь осолоджували у системі мікроосолодження Джо Уайта у кількох баках на 800 г сировини. Режим замочування включав: 8 год вимочування, 9 год вистоювання, 5 год вимочування при 17 °С (Sloop); 8 год вимочування, 10 год вистоювання, 5 год вимочування при 17 °С (Risø 56) та 7 год вимочування, 8 год вистоювання, 3 год вимочування при 17 °С (Risø 1508). Пророщування проходило протягом 94 год при 16 °С для сорту Sloop та 15 °С для двох мутантів з делеціями гордеїнів. Програма сушіння проходила протягом 21 год при температурі між 50-80 °С. Висушений солод затирали, як детально описано у статті Colgrave et al (2012). Після вказаного часу вистоювання для дії амілази затор переносили у бойлер і кип'ятили протягом 1 год для одержання сусла. Під час кип'ятіння кипляче сусло робили гірким за допомогою шишок хмелю до досягнення значень 21-22 IBU. Сусло охолоджували протягом ночі при 20 °С, а потім ферментували з дріжджами Fermentis US-05 при 18-20 °С до завершення бродіння через близько 2 тижні. Нефільтроване пиво переносили у бочонки та перед розливом у пляшки примусово насичували вуглекислотою.

Аналіз пива

Вибір 60 комерційних видів пива проведений, як перелічено у додатковій таблиці 1 статті Colgrave et al (2012). З двох різних пляшок кожного виду трикратно відбирали зразки (1 мл) та проводили дегазацію під зниженим тиском для видалення CO₂. Відбирали аліквоти (100 мкл) дегазованого пива та відновлювали їх додаванням 20 мкл 50 мМ ДТТ під N₂ протягом 30 хв при 60 °С. До цих розчинам добавляли 20 мкл 100 мМ йодацетаміду (IAM) та зразки інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. До кожного розчину додавали 5 мкл 1 мг/мл трипсину (Sigma) або хімотрипсину (Sigma) і зразки інкубували при 37 °С протягом ночі. Розщеплений пептидний розчин підкисляли додаванням 10 мкл 5 % мурашиної кислоти і пропускали через

фільтр з відсіканням за ММ 10 кДа (Pall, Австралія). Фільтрат ліофілізували, розчиняли у 1 % мурашиній кислоті і зберігали при 4 °С до проведення аналізу.

Аналіз нерозщепленого сусла і пива

Сусло і пиво (0,1 мл), одержані з ячменю дикого типу (Sloop) та мутантів з делеціями гордеїнів, пропускали через фільтр з відсіканням за молекулярною масою 10 кДа (Pall) центрифугуванням при 14000 об/хв протягом 30 хв для отримання пептидної фракції, придатної для аналізу ЖХ-МС/МС. Пептидну фракцію (10 мкл) аналізували на мас-спектрометрі QStar Elite.

МС з Q-TOF

Зразки хроматографічно розділяли на системі для нано-BEPX Shimadzu (Shimadzu Scientific, м Райдалмір, Австралія), використовуючи колонку Vydac MS C18 300 Å (150 мм × 0,3 мм) з розміром часток 5 мкм (Grace Davison, м Дирфільд, США) з використанням лінійного градієнту 2-42 % розчинника В протягом 20 хв при швидкості потоку 3 мкл/мл. Рухомі фази складалися з розчинника А (0,1 % мурашиної кислоти) та розчинника В (0,1 % мурашиної кислоти/90 % ацетонітрилу/10 % води). Мас-спектрометр з квадрупольним часопролітним детектором для кількісного аналізу QqTOF QStar Elite використовували у стандартному МС/МС інформаційно-залежному режимі збору даних з нано-електророзпилюючим джерелом іонізації. Оглядові МС-спектри збирали (m/z 400-1800) протягом 1 с наступними трьома МС/МС-вимірюваннями іонів-попередників з найбільшою інтенсивністю (10 імпульсів/друге порогове значення, заряджений стан від 2+ до 5+ та діапазоном мас для МС/МС m/z 100-1600) з використанням програми виробника «Smart Exit». Родоначальні іони, що потрапили раніше, виключали з циклів збору даних МС/МС, що повторювалися, протягом 30 с (допустиме відхилення за масою 100 мДа).

МС з лінійною іонною пасткою (потрійний квадрупіль)

Відновлені та алкільовані триптичні пептиди аналізували на мас-спектрометрі з QTRAP Applied Biosystems 4000 (Applied Biosystems, м Фремінгхем, Масачусетс, США), обладнаним джерелом іонізації TurboV, що функціонувало у режимі генерації позитивних іонів. Зразки хроматографічно розділяли на HBEPX Shimadzu Nexera (Shimadzu) з використанням колонки Phenomenex Kinetex C18 (2,1 мм × 10 см) з лінійним градієнтом з 5-45 % ацетонітрилу (ACN) протягом 15 хв зі швидкістю потоку 400 мкл/хв. Елюент з BEPX безпосередньо подавали на мас-спектрометр. Дані отримували та обробляли з використанням Analyst 1.5 software™. Аналізи з інформаційно-залежним збором даних (IDA) проводили з покращеним МС-скануванням (EMS) у діапазоні мас 350-1500 як оглядовим скануванням, так і з активізацією при зборі тандемних мас-спектрів. Відбирали два найбільш інтенсивних іона із зарядженим станом 2-5, який перевищив певне порогове значення (100000 імпульсів) і спочатку піддавали їх скануванню з покращеним розрізненням (ER) перед збиранням даних покращеного сканування продуктів (EPI) у діапазоні мас 125-1600.

Аналіз мас-спектрів і пошук у базах даних

Для ідентифікації білків використовували програмне забезпечення ProteinPilot™ 4.0 (Applied Biosystems) з алгоритмом Paragon. Дані тандемної мас-спектрометрії вивчали у порівнянні з даними триптичного або хімотриптичного розщеплень in silico білків Triticeae з баз даних Uniprot (версія 2011/05) та NCBI (версія 2011/05). Усі параметри пошуку визначали як модифікацію йодацетамідом з алкілюванням цистеїнів з використанням як ферменту розщеплення трипсину або хімотрипсину. Модифікації встановлювали як набори модифікацій «опрацювання генерика» або «біологічний препарат», представлені з цим програмним пакетом, які містили 126 можливих модифікацій, наприклад, ацетилювання, метилювання та фосфорилування. Набір модифікацій для опрацювання генерика містить 51 потенційну модифікацію, які можуть проходити в результаті підготовки зразків, наприклад, окиснення, дегідратація та дезамінування. Пептиди з одним пропущеним розщепленням були включені до аналізу.

Створення і використання спеціально розробленої бази даних для зернових культур

Спеціальну базу даних без резервування запасних білків насіння зернових культур створювали включенням всіх опублікованих білкових послідовностей з нуклеотидних елементів у NCBI, індексів генів TIGR або наборів транскриптів рослин TIGR, що належать видам Triticum, Hordeum, Avena, Secale та Triticosecale. Нуклеотидні послідовності для вищевказаних видів транслювали в шести рамках, обрізаних так, щоб містити лише саму довгу рамку зчитування. Набір результатуючих білкових послідовностей потім робили нерезервованим. Тільки послідовності зі 100 % відповідністю від початку до кінця з'єднували разом для збереження усіх варіацій. Нарешті, ці файли фільтрували так, щоб зберегти лише елементи, що містили слова глютен, гліадин, глютенін, гордеїн, авенін або декалін. Проводили пошук даних тандемної мас-спектрометрії у порівнянні зі спеціальною базою даних зернових культур.

Вирівнювання білків та ідентифікація прототипних пептидів

Вирівнювали всі відомі білки гордеїни у базі даних Uniprot та ймовірні білки гордеїни в базі даних TIGR. Всередині кожної родини (B, C, D або γ) пептиди, які були розповсюдженими, вибирали в якості представника родини. Для кожного пептиду визнали MRM-переходи, в яких значення m/z іона-попередника (Q1) базувалося на розмірі та очікуваному заряді, а значення m/z фрагментарних іонів (Q3) передбачали з використанням шаблонів фрагментації та/або даних, зібраних у послідовностях операцій з визначення характеристик. У попередніх аналізах використовували аж до шести переходів, MRM-переходи деталізували та відбирали два кращих MRM-переходи на пептид для використання у кінцевому методі, причому найбільш інтенсивний MRM-перехід використовували як кількісний параметр, а другий найбільш інтенсивний перехід використовували як якісний параметр.

Мас-спектрометрія з MRM

Експерименти з MRM використовували для кількісного визначення триптичних пептидів, що походять з горденів. Для обох IDA- та MRM-ініційованих експериментів MC/MC швидкість сканування встановлювали 1000 Да/с та пептиди фрагментували у комірці зіткнень з газом азотом з використанням енергії зіткнення, що біжить, у залежності від розміру та заряду іона-попередника. Кількісне визначення пептидів гордеїнів досягли з використанням спланованих експериментів з MRM-сканування, використовуючи вікно детекції на 120 с для кожного MRM-переходу і тривалість циклу 1 с. Перший квадрупіль використовували для вибору співвідношення маса-заряд (m/z) аналіту, так названого іона-попередника. Іон-попередник потім передавався у комірку зіткнень (другий квадрупіль). Відбувалася індукована зіткненнями дисоціація (CID), що приводила до отримання фрагментованих іонів, які передавалися на третій квадрупіль. Друга стадія відбору за масою проходила специфічно, орієнтуючись на значення m/z відомих фрагментованих іонів. Дві стадії відбору за масою відомі як Q1 та Q3, прив'язуючись до квадруполів, в які вони потрапляють. Таким чином, перехід від Q1 до Q3, відомий як MRM-перехід, є високоспецифічним та вибірконим для аналіту, що вибирається.

Відносне кількісне визначення гордеїнів

Відносне кількісне визначення кожного гордеїну проводили інтегруванням площі піку найбільш інтенсивного MRM-переходу для кожного пептиду. Середню площу піків визначали отриманням середньої з двох повторностей інжекцій (у різні дні) з пляшок A та B (що представляють біологічні повторності). Результати представлені у вигляді відсоткового вмісту кожного білка гордеїну відносно середнього вмісту гордеїну у всіх видах пива, що містять глютен.

Приклад 2 Визначення характеристик гордеїнів в ячмінній муці

Гордеїни, екстраговані з ячмінної муки (сорт дикого типу Sloop) солюбілізацією у спиртовому розчині, очищували FPLC як описано у Прикладі 1. Очищені фракції гордеїнів відновлювали, алкілували та піддавали розщепленню трипсином або хімотрипсином. Після ферментативного розщеплення субфракцію до 10 кДа аналізували методом ЖХ-МС/МС для ідентифікації гордеїнів, що були присутні в очищеній фракції проламінів з муки, для отримання повного набору білків гордеїнів, які очікувано могли бути знайдені у пиві, звареному з цієї муки. Використовуючи рівень хибнопозитивних результатів (FDR) 1 %, після розщеплення трипсином всього ідентифікували 144 білка, а після розщеплення хімотрипсином всього ідентифікували 55 білків.

У табл 1 перелічені білкові продукти гордеїнів, виявлені у муці після розщеплення трипсином. Серед виявлених найбільш розповсюджених білків були раніше опубліковані B3-гордеїн (№ доступу P06471, Kristoffersen et al., 2000), γ -3-гордеїн (P80198, Fasoli et al., 2010) та ймовірний γ -1-гордеїн (P17990, Cameron-Mills et al., 1988). Аналогічним чином виявили у надлишку D-гордеїн (Uniprot: Q84LE9, Gu et al., 2003). Інші виявлені менш розповсюджені білки включали два γ -гордеїни та B1-гордеїн, які були відсутні як у базі даних NCBI так і в Uniprot (табл 1). Ці білки ідентифікували пошуком у спеціально розробленій базі даних, що містить білки, що транскрибуються, зернових культур з нуклеотидних елементів у NCBI, індексів генів TIGR або наборів транскриптів рослин TIGR. Виявлено кілька пептидів, що відповідали ймовірним γ -гліадину і глютенінам (з пшениці) та авеніноподібному білку-A (з пшениці та колінниці). Повідомлялося, що авеніноподібні A-білки повинні бути присутніми у пиві (Picariello et al., 2011) на основі даних детекції пептиду з 15 амінокислот (QQCCQPLAQISEQAR, SEQ ID №: 5), що отримувався в результаті триптичного розщеплення полоси білка масою 16-17 кДа, виділеного електрофорезом з ДСН-ПААГ. Ця пептидна послідовність співпадала з послідовністю єдиного білка з ячменю при пошуку за допомогою BLASTp, разом з додатковим пептидом з 13 амінокислот (ак), співпавши з такою ж ймовірною білковою послідовністю (Uniprot: F2EGD5). При картуванні також виявлений пептид з 11 ак (MVLQTLPSMCR, SEQ ID №: 6), що відповідає авеніноподібному A-білку (Uniprot: Q2A782) з *Aegilops cylindrica* (збиральна назва колінниця).

Подальший пошук у базі даних EST(TIGR) білків, що трансклюються, виявив білок H vulgare, який пояснив присутність пептиду з 11 ак. На основі гомології між ймовірним авеніноподібним білком-А та білками γ -гордеїнів, вони були включені у подальші аналізи.

- 5 Ідентифікації за окремими білками вказали на присутність С-гордеїнів всередині фракції гордеїнів, однак, вирівнювання послідовностей відомих білків С-гордеїнів виявило відсутність сайтів триптичного розщеплення всередині цих багатих глютаміном білків. Внаслідок цього, хімотриптичні розщеплення фракції гордеїнів привело до ідентифікації С-гордеїнів з аж до 80 % перекривання послідовностей (табл 2), підкреслюючи необхідність пошуку альтернативної стратегії розщеплення для визначення властивостей цього класу горденів.

10

Таблиця 1

Білки проламіни, ідентифіковані в очищеній FPLC фракції ячмінної муки після розщеплення трипсином

№ доступу Uniprot	№ доступу NCBI	№ доступу TIGR	Назва	Оцінка	Перекиривання	Пептиди
-	-	BE454297	В3-гордеїн ***	57,03	87,1	52
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -гордеїн-3	38,40	54,0	32
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-гордеїн **	34,70	55,6	41
P17990	123464	-	γ -гордеїн-1	27,70	74,7	23
-	-	TA30139_4513	γ -гордеїн ***	18,95	45,5	24
Q40026	75220903	TA29493_4513	B1-гордеїн **	8,58	46,6	19
Q4G3S1	122220129	-	B3-гордеїн *	5,55	15,7	10
P06472	123460	-	C-гордеїн *	4,56	23,9	4
C7FB16	255348358	-	B-гордеїн **	4,00	22,4	22
Q2A782	122238432	-	Авеніноподібний А-білок *	4,00	14,4	2
F2XAR6	327365751	-	γ -гліадин **	3,89	9,5	3
-	-	TA29452_4513	B1-гордеїн ***	3,87	52,2	18
P17991	123461	-	C-гордеїн *	3,87	95,8	3
-	-	AJ433315	γ -гордеїн ***	3,53	99,1	19
P06471	123459	HVB3HORD	B3-гордеїн	2,00	73,1	42
B9VSH7	222538169	-	D-гордеїн (подібний до глютеніну з ВММ) **	2,00	16,1	9
Q3YAF9	122217636	-	B-гордеїн **	2,00	21,7	8
B5A818	-	-	B-гордеїн (подібний до глютеніну з НММ) **	2,00	27,2	7
D4HNB5	-	-	B-гордеїн (подібний до глютеніну з НММ) **	2,00	13,2	4
Q8S3W0	75159492	-	D-гордеїн (подібний до глютеніну з ВММ) **	2,00	5,0	6
F2EGD5	326501830	-	Авеніноподібний А-білок *	2,00	16,2	2

Перелічені номери доступу для кожного білка: * вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена анотованим доказом транскрипта (Uniprot); ** вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена ймовірним білком, що походить з генома (Uniprot); *** вказує на те, що ідентифіковано новий білок при пошуку у базі даних у порівнянні з неанотованими EST з TIGR

Таблиця 2

Білки проламіни, ідентифіковані в очищеній FPLC фракції ячмінної муки після розщеплення хімотрипсином

№ доступу Uniprot	№ доступу NCBI	№ доступу TIGR	Назва	Оцінка	Перекривання	Пептиди
P06471	123459	HVB3HORD	B3-гордеїн	85,95	86,4	51
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-гордеїн **	54,28	36,2	28
Q41210	75102504	-	C-гордеїн **	50,10	88,7	44
P80198	1708280	TA29416_4513	γ-гордеїн-3	36,38	69,9	19
Q40053	19001	-	C-гордеїн (Hor1-17) **	28,93	83,9	41
-	-	TA30139_4153	γ-гордеїн ***	21,31	59,2	11
P06470	123458	-	B1-гордеїн	10,13	25,1	14
Q0PIV6	110832715	-	B-гордеїн **	10,00	62,4	22
P17990	123464	-	γ-гордеїн-1 *	8,00	50,9	7
P17992	123462	-	C-гордеїн *	6,02	65,1	7
Q571R2	75271341	-	C-гордеїн (подібний до σ-гліадину) *	4,00	61,3	3
-	-	TA29452_4513	B1-гордеїн ***	2,13	59,4	14
C7FB16	255348358	-	B-гордеїн **	2,02	61,9	15
-	-	TA28105_4153	Подібний до C-гордеїну ***	2,01	53,4	1
-	-	BG416634_F0	B3-гордеїн ***	2,00	81,5	32
-	-	BI950745_F1	B3-гордеїн ***	2,00	33,6	15
-	-	TA29459_4513	B-гордеїн (подібний до GBSS Wx-TmA) ***	2,00	60,9	12
Q5PU42	56126405	-	B-гордеїн (подібний до глютеніну з НММ) **	2,00	22,6	6
Q4G3S5	57118089	-	B3-гордеїн *	2,00	24,0	6

Перелічені номери доступу для кожного білка: * вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена анотованим доказом транскрипта (Uniprot); ** вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена ймовірним білком, що походить з генома (Uniprot); *** вказує на те, що ідентифіковано новий білок при пошуку у базі даних у порівнянні з неанотованими EST з TIGR

Приклад 3 Визначення властивостей гордеїнів у суслі і пиві

- Потім проводили аналіз суслу – рідини, екстрагованої у процесі затирання під час варіння пива, і пива та ідентифікували подібний набір проламінів (табл. 3). Усього ідентифікували 27 білків у суслі та 79 білків у пиві, найбільше розповсюджені білки були білком 1 неспецифічного перенесення ліпідів (LTP1) та інгібіторами α-амілази/трипсину (CMd, CMb, CMA). Білки глютену, ідентифіковані у суслі, включали авеніноподібний А-білок (18 пептидів), γ-гордеїн-3 (10 пептидів) та D-гордеїн (4 пептиду), які раніше виявили у збагаченій фракції гордеїнів. Однак, примітно, що >50 % пептидів були семі-триптичними (розщепленими на одному кінці за сайтом, що відрізняється від Lys/Arg), що передбачає значну деградацію білків, що пройшла протягом процесу варіння пива. Виявлений авеніноподібний А-білок (№ доступу у базі даних GenBank BE195337), ідентифікований при пошуку у базі даних EST, з >60 % перекриванням послідовностей (12 пептидів), збільшуючи достовірність цієї ідентифікації білка.
- Примітно, що у пиві до порогу виявлення були відсутніми білки C-гордеїни, але щоб переконатися, що це не хибнопозитивний результат з причини низької кількості триптичних сайтів, проводили хімотриптичне розщеплення, яке підтвердило відсутність у пиві C-гордеїнів (табл. 3). Переважно, відсутність C-гордеїнів пов'язано з їх нерозчинністю у воді C-гордеїни

складаються з багатьох октапептидних повторів з консенсусною послідовністю PQQPFPQQ (SEQ ID №: 7), що надають їм високу нерозчинність. У суслі ідентифікували багатьох з продуктів деградації С-гордеїнів, але вони не зберігалися після етапів варіння і фільтрації, що приводять до одержання пива.

- 5 Для того, щоб охарактеризувати пептидні фрагменти, сусло і пиво пропускали через фільтр з відсіканням за молекулярною масою 10 кДа та аналізували без ферментативного розщеплення. При 1D-ПААГ аналізі виявили, що етап фільтрації був ефективним для видалення білків з пива МС-аналіз виявив присутність кількох усічених продуктів гордеїнів або продуктів гордеїнів, що деградували. У табл 4 перелічені ідентифіковані пептидні фрагменти.
- 10 На додаток до пептидів гордеїнів у пиві і суслі ідентифікували пептиди, що походять з більшої кількості білків ячменю, які включали серпін-Z4, білок 1 неспецифічного транспорту ліпідів, α -амілазу, β -амілазу, гордоіндоли (B1, B2) та GAPDH (перелічені у табл. 4 та додатковій таблиці 2 у статті Colgrave et al., 2012). Цікаво, що була велика кількість фрагментів С-гордеїну, виявлених у суслі, при лише слідовому вмісті пептидів С-гордеїнів, виявлених у пиві.
- 15 Визначення властивостей пива у відсутності ферментативного розщеплення чітко демонструє, що у доповнення до інтактних гордеїнів була присутня велика кількість фрагментів гордеїнів, що частково деградували, і вони також можуть впливати на ціліакальну токсичність. Багато з цих фрагментів пептидів містили серії Gln та Pro, які можуть викликати імунологічну відповідь щодо целиакії. Приклади виявлених потенціальних імуногенних пептидів включають
- 20 FVQRPQQPFLQPHQP (авеніноподібний А-білок; GenBank: TA31086, SEQ ID №: 8), YPEQPQQPFWQQPT (γ -1-гордеїн; P17990, SEQ ID №: 9), LERPQQLFPQWQPLPQQPP (γ -3-гордеїн; P80198, SEQ ID №: 10) та LIIPQQPQQPFLQPHQP (С-гордеїн; P17991, SEQ ID №: 11), де підкреслена послідовність має високу гомологію з імуногенними пептидами, опублікованими раніше (Tye-Din et al., 2010; Kahlenberg et al., 2006).

25

Таблиця 3

Проламіни, ідентифіковані у суслі (розщеплені трипсином)

№ доступу Uniprot	№ доступу NCBI	№ доступу TIGR	Назва	Оцінка	Перекривання	Пептиди
F2EGD5	326501830	-	Авеніноподібний А-білок *	29,33	41,6	18
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -гордеїн-3	18,05	33,2	10
-	-	BE195337	Авеніноподібний А-білок ***	14,00	47,0	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-гордеїн **	8,08	8,9	4
Проламіни, ідентифіковані у пиві (розщеплені трипсином)						

№ доступу Uniprot	№ доступу NCBI	№ доступу TIGR	Назва	Оцінка	Перекивання	Пептиди
P80198	1708280	TA29416_4513	γ-гордеїн-3	55,62	53,6	33
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-гордеїн **	30,16	22,2	23
P06471	18914	HVB3HORD	B3-гордеїн	17,81	24,6	9
P17990	123464	-	γ-гордеїн-1 *	16,98	31,9	9
-	-	BE195337	Авеніноподібний А-білок ***	15,66	64,6	12
F2EGD5	326501830	-	Авеніноподібний А-білок *	8,06	35,3	8
Q4G3S5	57118089	-	B3-гордеїн *	5,48	12,6	6
Q40026	75220903	TA29493_4513	B1-гордеїн **	2,01	8,6	7
Q94IL5	75250230	-	D-гордеїн (подібний до глютеніну з BMM) **	2,00	4,6	8
Проламіни, ідентифіковані у пиві (розщеплені хімотрипсином)						
№ доступу Uniprot	№ доступу NCBI	№ доступу TIGR	Назва	Оцінка	Перекивання	Пептиди
P80198	1708280	TA29416_4513	γ-гордеїн-3	19,75	56,1	12
Q40022	829269	-	B1-гордеїн *	13,80	51,4	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-гордеїн **	12,00	26,0	6
P17990	123464	-	γ-гордеїн-1 *	5,59	22,5	3
F5A7G6	-	-	B-гордеїн (подібний до глютеніну з HMM) **	2,00	23,2	5
Q6EEZ0	-	-	γ-гордеїн-3 **	2,00	25,8	2

Перелічені номери доступу для кожного білка: * вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена анотованим доказом транскрипта (Uniprot); ** вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена ймовірним білком, що походить з генома (Uniprot); *** вказує на те, що ідентифіковано новий білок при пошуку у базі даних у порівнянні з неанотованими EST з TIGR

5 Таблиця 4. Пептиди, що походять з білків гордеїнів, виявлені у субфракції пива 10 кДа. Епітопи, відмічені жирним шрифтом, показують високу гомологію послідовностей з епітопами глютену, які розпізнані MAb Mendez R4, у порівнянні з протамінами жита (QQPFP (SEQ ID №: 12), QQQFP (SEQ ID №: 13), LQPFP (SEQ ID №: 14), QLPFP (SEQ ID №: 15))^a Ці пептиди можуть викликати імунну відповідь у пацієнтів з ЗЦ.

Таблиця 4

Назва ^b	Достов.	Пептид	m/z	Маса	Δm (м.ч.)
D-гордеїн (Q84LE9 **)	99	RVVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 16)	891,99	1781,97	13,41
	99	VVDQQLVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 17)	870,45	1738,89	19,72
	99	VVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 18)	813,93	1625,85	5,17
	99	VVDQQLVGQLPW (SEQ ID №: 19)	691,38	1380,74	2,46
	99	QLVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 20)	649,85	1297,68	16,25
	99	QLVGQLPWSTG (SEQ ID №: 21)	593,30	1184,59	22,03
	99	LVGQLPWSTGLQM (SEQ ID №: 22)	715,37	1428,73	12,46
	99	LVGQLPWSTGL (SEQ ID №: 23)	585,83	1169,65	5,55
	99	LVGQLPWSTG (SEQ ID №: 24)	529,28	1056,54	14,86
	99	VGQLPWSTGLQM (SEQ ID №: 25)	658,83	1315,64	14,06
	99	VGQLPWSTGL (SEQ ID №: 26)	529,28	1056,54	16,75
	99	(p)QLAAQLPAMCRLEGS[ГексНАс] (SEQ ID №: 27)	887,41	1772,80	22,05
	99	VVRQYEQQTVEVPSKGGSFYPGGTAPP (SEQ ID №: 28)	927,12	2778,35	5,79
γ-3-гордеїн (P80198)	99	FVLPPQQAQFKVVG (SEQ ID №: 29)	838,46	1674,90	4,24
	99	FVLPPQQAQF (SEQ ID №: 30)	603,31	1204,61	12,54
	99	AIVMQQQVQQQVGHGF (SEQ ID №: 31)	899,43	1796,85	26,60
	99	LERPQLFPQWQPLPQQPP (SEQ ID №: 32)	776,41	2326,19	12,21
	99	LFPQWQPLPQQPP (SEQ ID №: 33)	788,41	1574,82	6,03
	99	LQQLGQGMPQL (SEQ ID №: 34)	663,85	1325,69	16,98
	95	VVGSLVIQT (SEQ ID №: 35)	458,27	914,53	9,84
γ-1-гордеїн (P17990 *)	99	LQQPQHQPQPTQQFPQRP _n (SEQ ID №: 36)	777,39	2329,15	8,16
	99	YPEPQQPFPWQQPT (SEQ ID №: 37)	935,93	1869,84	16,15
	99	GVVQPQQLAQME (SEQ ID №: 38)	664,31	1326,61	41,08
	99	[p]QPQHQPQPTQQFPQRP (SEQ ID №: 39)	691,33	2070,98	9,90
Авеніноподібний А-білок (BE195337 ***)	99	FVQPQQQVPVEITR (SEQ ID №: 40)	834,94	1667,87	19,61
	99	FVQPQQQVPVEI (SEQ ID №: 41)	706,37	1410,72	18,78
С-гордеїн (P17991 *)	98,2	LIIPQQPQQPFPLQPHQP (SEQ ID №: 42)	1053,59	2105,17	14,82
	99	IIPQQPQQPFPLQPHQP (SEQ ID №: 43)	997,05	1992,08	13,40
В3-гордеїн (P06471)	98,4	VQVQIPFVHPSI (SEQ ID №: 44)	682,38	1362,74	16,22
Авеніноподібний А-білок (F2EGD5 *)	99	SFGQPQQQVPVEVMR (SEQ ID №: 45)	865,43	1728,84	13,0
С-гордеїн (Q40053 *)	95,8	IIPQQPFPLQPQFPQQPQQPLPQQP (SEQ ID №: 46)	1081,25	3240,73	11,08
С-гордеїн (TA28105 ***)	96,4	IPLQPQ[деза]QFPQQPP (SEQ ID №: 47)	808,40	1614,79	30,53

a Kahlenberg et al (2006).

b Перелічені номери доступу для кожного білка: * вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена анотованим доказом транскрипта (Uniprot); ** вказує на те, що ідентифікація білка підтверджена ймовірним білком, що походить з генома (Uniprot); *** вказує на те, що ідентифіковано новий білок при пошуку у базі даних у порівнянні з неанотованими EST з TIGR

5 Приклад 4 Відносне кількісне визначення гордеїнів у пиві методом мас-спектрометрії з MRM
Визначення протеомних властивостей очищених гордеїнів і пива у Прикладах 2 та 3 дало можливість встановити основні білки гордеїни, що були присутні у ячмені. Ідентифікували метод моніторингу множинних реакцій (MRM) як корисний інструмент для кількісного визначення пептидів та білків. У цьому методі після триптичного розщеплення білків протеолітичні фрагменти хроматографічно розділяли методом ВЕРХ та аналізували методом мас-

спектрометрії з MRM. Перший квадрупіль (Q1) вибирав значення першого пептиду m/z (маса попередника) та передавав цей іон у комірку зіткнень (Q2). Індукована зіткненнями дисоціація приводила до отримання серій фрагментарних іонів, пов'язаних з амінокислотною послідовністю протеолітичних фрагментів. Потім діагностичні фрагментарні іони відбирали у третьому квадруполі (Q3) та передавали на детектор, що дозволяв кількісно визначати пептиди, що представляють інтерес. Як правило, застосовували три MRM-переходи на пептид та аналізували щонайменше два пептиди на білок.

З кожної з родин білків вибирали одну ізоформу для моніторингу вмісту глютену у сортах пива, зварених з селективно-виведених ліній ячменю (див нижче). Для розробки кількісного аналізу вибирали множину триптичних пептидів (>2 пептидів/білок). У дослідницьких експериментах, в яких ці пептиди були раніше виявлені, m/z пептиду та інформацію про фрагментарний іон використовували для визначення у передбаченому MRM-переході. Набір пептидів, які спочатку не були ідентифіковані, включали у MRM-аналіз таким чином, щоб використовувалося мінімум два пептиди на білок. У таких випадках значення значення часу утримування не були відомі, і не можна було спланувати MRM-переходи в експериментах першого проходу. Визначали значення часу утримування пептидів та використовувалися у наступних експериментах спланованих MRM-переходів.

Пиво, одержане з єдиного елітного австралійського пивовареного ячменю ("Sloop"), використовували для розробки і вдосконалення методу MRM, оскільки воно містило повний набір білків гордеїнів, тоді як варіанти ячменю (Risø 56 та Risø 1508), як очікувалося, мали низький вміст або були позбавлені В- та С-гордеїнів. Коли види пива зі зразків зерна ячменю дикого типу та двох мутантних за гордеїнами сортів зерна ячменю (Risø 56 та Risø 1508) проаналізували з використанням MRM-аналізу, у пиві з ячменю дикого типу було чітко виявлені вісім відібраних пептидів (три MRM-переходи на пептид). У пиві з Risø 56 виявлено близько трьохкратне зменшення кількості пептидів D-гордеїнів, а пептиди В-гордеїнів до порогу виявлення були відсутніми. У пиві з Risø 1508 виявлено додаткове зменшення кількості кожного виміряного пептиду, але виявлено слідову кількість авеніноподібного А-білка.

Відтворюваність аналітичного методу оцінювали дослідженням пива з одного сорту ячменю ("Sloop"). По-перше, пиво піддавали кільком циклам заморожування-відтаювання (будь-яка кількість з 1, 10, 20 або 50 циклів) і не виявили статистично значимої різниці (коефіцієнт варіації, KB, <15 %) для площ піків для кожного з MRM-переходів, що проходили моніторинг, навіть після 50 циклів. По-друге, ефективність розщеплення досліджували у шести повторностях розщеплень, що дали KB <15 %. Аналітичну відтворюваність оцінювали проведенням інжектуювань чотирьох повторностей для кожного розщеплення з KB <15 %. Нарешті, оцінювали варіацію вмісту гордеїнів між двома різними пляшками пива і знайшли її рівною <10 %.

Аналіз комерційних сортів пива

Провели додаткову валідацію методу MRM для кількісного визначення гордеїнів у пиві аналізом вмісту глютену у виборці з 60 комерційних видів пива, включаючи види пива, марковані як такі, що мають низький вміст глютену та безглютенові. Дубльовані зразки з окремих пляшок обробляли для відновлення, алкілювання і розщеплення (Приклад 1) та аналізували методом мас-спектрометрії з MRM На фіг. 2 показано відносний кількісний вміст авеніноподібних А-білків (А), В-гордеїнів (В, С), D-гордеїнів (D) та γ -гордеїнів (Е) у комерційних видах пива у порівнянні з пивом зі Sloop. У порівнянні з середніми значеннями для безглютенових видів пива у комерційних видах пива виявлено варіювання у типі (присутність родин гордеїнів) та кількості (між 1-380 % у порівн з середнім для будь-якого заданого білка гордеїну). Вісім видів пива (№№ 17, 47, 49, 50, 51, 52, 58 та 60) були марковані як безглютенові, оскільки вони зварені з солоду сорго, тефу, рису, проса або кукурудзи. У цих зернових культурах відсутні білки глютену, що присутні в ячмені і пшениці MRM-аналіз підтвердив, що вони були позбавлені вмісту білків гордеїнів та шуканих білків, споріднених гордеїнам (авеніноподібний А-білок). Види пива 17 та 50-52 виготовлені на основі сорго, на пиві 47 не вказано з чого воно було виготовлено, пиво 49 виготовлене з проса, пиво 58 зварене з солоду сорго, тефу і рису, а пиво 60 було пивом не зернового походження. При перевірці двох видів пива (57 і 59) вони були класифіковані як такі, що мали низький вміст глютену (<10 м.ч.), відносний вміст гордеїну не відрізнявся від середнього вмісту гордеїну серед цього діапазону досліджених видів пива. У пиві 57 виявлено низький вміст авеніноподібного А-білка (~50 % у порівн з середнім), але неочікувано виявлено значні рівні пептидів, що походять з В1- (>300 % у порівн з середнім), D- (~105 %) та γ 3-гордеїнів (~62 %). У пиві 59 виявлено низькі, але значні рівні В1-, D- та γ -гордеїнів (55 %, 42 % та 92 %, відповідно) та еквівалентний вміст авеніноподібного А-білка у порівнянні з виявленими у видах пива, що містять глютен.

Висновки

Види пива, виготовлені з ячменю, містили глютен, що походить із зерна, яке використано у процесі варіння пива. Рівень глютену у пиві може вимірюватися з використанням ІФА, однак, існує багато обмежень, пов'язаних з точним вимірюванням вмісту гордеїнів з використанням технології ІФА. У вищевказаних Прикладах було розроблено мас-спектрометричний аналіз для визначення властивостей повного набору гордеїнів в очищених препаратах гордеїнів, сусли і пива та проведення ідентифікації найбільш розповсюджених білків гордеїнів. Аналіз з використанням мас-спектрометрії був робастним та чутливим для вимірювання гордеїну (глютену) у муці, суслі і пиві та міг легко застосовуватися для солоду.

Приклад 5 Ідентифікація нульової мутації в гені *Hor3* ячменю

Поліпептид D-гордеїну ячменю масою 105 кДа кодується геном *Hor3* на довгому плечі хромосоми 1H (Gu et al., 2003). Дика раса ячменю, позначена Ethiopian R118, ідентифікована як така, що не накопичує D-гордеїни (Brennan et al., 1998), та отримана із загальнодоступної колекції зародкової плазми у Центрі відкритих колекцій Джона Інса (№ доступу 3771). Ця лінія була дику расою ячменю, що у найвищій мірі не підходяща для комерційного виробництва зерна

Зерно Ethiopia R118 вирощували у теплиці. Виявлено, що отримані рослини сегрегуювали на 2-рядний і 6-рядний фенотипи та на чорне пігментоване насіння і зелене насіння. Вибирали дворядну лінію, яка продукувала зелене насіння, і схрещували її з сортом Sloop. Відбирали половини зерен F2, які були негативними за продукцією D-гордеїну. Рослини цієї лінії зворотно схрещували з диким типом Sloop, і знову відбирали рослину F2, яка була нульовою за D-гордеїном. Цю рослину зворотно схрещували з сортом Sloop і рослину-нащадок знову зворотно схрещували для отримання лінії BC₂, яка була негативною за продукцією D-гордеїну у генетичному оточенні, що складало близько 87,5 % генома Sloop.

Ген, кодує D-гордеїн, ампліфікували з геномної ДНК, виділеної з кожної з негативних за D-гордеїном рослин Sloop BC₂, отриманих з сорту Ethiopia R118 та дикого типу Sloop. Виділення провели методом ПЛР у стандартних умовах і створили серії з 3 фрагментів, що перекриваються. Пари праймерів, використані при ампліфікації були такими:

Фрагмент 1

5' Drop1 GACACATATTCTGCCAAAACCCC (SEQ ID №: 60) та

3' Drop3 ACGAGGGCGACGATTACCGC (SEQ ID №: 61)

Фрагмент 2

5' Drop1b GAGATCAATTCATTGACAGTCCACC (SEQ ID №: 62) та

3' Drop1 CTTGTCTGACTGCTGCGGAGAAA (SEQ ID №: 63)

Фрагмент 3

5' Drop2 GCAACAAGGACACTACCCAAGTATG (SEQ ID №: 64) та

3''' Drop2 GCTGACAATGAGCTGAGACATGTAG (SEQ ID №: 65)

Очищали продукти ампліфікації та визначали нуклеотидну послідовність з кожної рослини. Підібрана послідовність з сорту Sloop була 2838 п.н довжиною (SEQ ID №: 72), а послідовність, отримана з Ethiopia R118, була 2724 п.н довжиною (SEQ ID №: 73). Ймовірний стартовий кодон трансляції ATG для обох білків знаходився у положенні 398-400 відповідних послідовностей. Для сорту Sloop кодон термінації знаходився у нуклеотидному положенні 2641-2643, кодує білок з 747 амінокислотних залишків. Аналіз послідовності з сорту Ethiopia R118 виявив, що у порівнянні з Sloop була зміна С на G у положенні 848 (положення 450 відносно стартового кодону), яка введена у стоп-кодон TAG всередині рамки у ген *Hor3*, що приводило до усичення у білку поліпептиду у положенні 150 (фіг 3). Це усичення поліпептиду D-гордеїну знаходилося перед доменом багатим проліном та глутаміном, який містить епітопи, ідентифіковані як імуногенні для прояву целіакії.

Ця нуклеотидна заміна ліквідує сайт *KpnI*, який був присутній у нуклеотидній послідовності дикого типу у сорті Sloop, та дозволила розробити кодомінантний маркер CAPS з цією метою ампліфікували фрагмент ДНК з 272 п.н з використанням праймерів 5' Dхор-маркер (GGCAATACGAGCAGCAAAAC, SEQ ID №: 66) та 3' Dхор-маркер (CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC, SEQ ID №: 67) (фіг. 4). Продукти ампліфікації потім інкубували з ферментом рестрикції *KpnI* та проаналізували електрофорезом на агарозних гелях. Фрагмент з ячменю дикого типу Sloop розщеплювали *KpnI* для отримання двох фрагментів з 164 п.н та 108 п.н. У протилежність цьому, фрагмент з 272 п.н з D-нульового сорту Ethiopia R118 не розщеплювався. Отже, цей спосіб чітко розпізнавав алелі дикого типу та нульові алелі гена, що кодує D-гордеїн.

Приклад 6 Ідентифікація молекулярного маркера для делеційної мутації у локусі *Hor2* ячменю

Локус *Hor2* на короткому плечі хромосоми 1H у ячмені містить родину з близько 20-30 генів, кожний кодує B-гордеїн у діапазоні розмірів близько 36-45 кДа (Anderson et al., 2013). Лінія Risø

56 є індукованою гама-випромінюванням мутацією, яка має делецію з близько 86 п.н., включаючи всі або майже всі гени В-гордеїнів Kreis et al., (1983). Цю мутацію використовували для створення подвійної мутації Hor2-lys3a, як раніше описано у статті Tanner et al (2010), що експресує значно зменшені рівні всіх горденів.

Конструювали молекулярний маркер та випробували його для виявлення локусу Hor2 дикого типу та розрізнення його від Hor2-делетованого локусу наступним чином з використанням стандартних умов ПЛР. Відсутність полоси ПЛР для В1-гордеїну з 800 п.н було діагностичною ознакою відсутності (делеції) локусу Hor2, тобто наявності мутантного алеля Hor2 Пари праймерів, використані при ампліфікації були такими:

3' В1 Гор TCGCAGGATCCTGTACAACG (SEQ ID №: 68)

5' В1 Гор CAACAATGAAGACCTTCCTC (SEQ ID №: 69)

Для кожного зразка ДНК також проводили контрольну реакцію ПЛР, яка відтворювала характерну полосу ПЛР з 450 п.н., яка вказувала на присутність локусу гама-гордеїну і підтверджувала, що якість зразка ДНК була достатня для реакції на Hor2, використовуючи пари праймерів:

5' гама Гор 3 CGAGAAGGTACCATTACTCCAG (SEQ ID №: 70)

3' гама 3 цілий AGTAACAATGAAGGTCCATCG (SEQ ID №: 71)

Приклад 7 Створення тричі нульового мутанта ячменю

Рослини F5 двічі мутантної за Hor2-lys3a лінії ячменю, ідентифіковані як G1* у публікації WO2009/021285, вирощували у теплиці для отримання потомства F6. Рослини F6 потім вирощували у польових умовах для отримання потомства F7. Для комбінування мутацій Hor2-lys3a з нульовою мутацією Hor3, рослини генерації F7 схрещували з негативними за D-гордеїном рослинами BC₂, що походили з сорту Ethiopia R118 (Приклад 5), та покоління F1, самозапиленого для отримання насіння F2. Насіння F2 розрізали навпіл, половини з зародками пророщували та проводили скринінг паростків методом ПЛР на В- та D-гордеїни, як у Прикладах 5 та 6, і на гама-гордеїн. Половину кожного насіння, що залишилася та містила ендосперм, занурювали у розчин, який містив 8М сечовину, 1 % ДТТ, і екстраговані білки розділяли електрофорезом з ДСН-ПААГ. Відсутність характерних полос білків з масою близько 50 кДа вказувала на відсутність білків С-гор 3 близько 300 рослин F2 ідентифікували три тричі-нульових мутанта, позначених T1, T2 та T3. Очікувана частота для комбінації трьох рецесивних мутацій, кожної у гомозиготному стані, за генетикою Менделя склала 1/64, що передбачає, що локуси Hor2 (В-гордеїни) та Hor3 (D-гордеїни) розділені на хромосомі 1Н достатньо сильно для проходження легкої рекомбінації.

Ці три рослини, які були гомозиготними за кожною з трьох мутацій (Hor2-lys3a-Hor2), позначені T1, T2 та T3, підтримували і розмножували через три генерації покоління однієї насінини, відбираючи у кожній генерації 12 найбільш важких насінин. Середні маси насінин з насіння F3 цих ліній склали: T1, 38,2 мг; T2, 37,0 мг; T3, 39 мг. Вимірювали врожайність насіння на лінію (грам насіння на 20 колосків) та висоту рослин. Рослини, які продукували погано наповнені колоски, відкидали. Відібрали дві лінії F4: T2-4-8 та T2-6-A5, провели додаткові випробування у польових умовах 3 них вибрали T2-4-8, як таку, що мала трохи кращу врожайність зерна, і позначили її як ячмінь ULG3.0.

Важливим фенотипом ячмінного зерна, пов'язаним з розміром зерна, формою та індикатором врожайності зерна, є відсотковий вміст зерна, яке не проходить через сита з розмірами меш 2,8; 2,5; 2,2 та 2,0 мм, особливо сито на 2,8 мм. Менше зерно робить переробку і осолоджування менш ефективними у порівнянні з ячменем дикого типу. Цей фенотип називається "відсів 2,8 мм" і вказується як відсотковий вміст зерна, яке не проходить через конкретне сито. Для сортів дикого типу, таких як Sloop, параметр відсіву 2,8 мм, як правило, складає 95-98 %. Для дефіцитних за гордеїнами ліній, таких як подвійний мутант Hor2-lys3a (ULG2.0), параметр відсіву 2,8 мм у більшості випадків склав близько 53 %. Інколи, в залежності від умов росту, наприклад, засухи, він був менше 10 %, а більшість зерен могло проходити крізь сито 2,5 мм. Для ULG3.0 параметр відсіву 2,8 мм склав близько 54 %. Середні маси (мг) вирощених у польових умовах зерен склали: Sloop, 53,6+/-0,9, ULG2.0, 33,5+/-0,4; ULG3.0, 39,1+/-0,3. Отже, лінія ULG3.0 забезпечила врожайність зерна 69 %, у порівнянні з ULG2.0 з 50 %, відносно сорту Sloop дикого типу (100 %). Отже, лінія ULG3.0 представила значне покращення врожайності зерна, у порівнянні з лінією ULG2.0. Тим не менш, параметр відсіву 2,8 мм залишився проблемним питанням для ячменю ULG3.0.

Приклад 8 Створення додаткових тричі нульових мутантів ячменю зі збільшеною врожайністю

Хоча лінія ячменю ULG3.0 продукувала збільшену врожайність зерна у порівнянні з ULG2.0, усе таки потрібно її додатково збільшити. У зв'язку з чим, рослини ULG3.0 схрещували з

рослинами сортів дикого типу Sloop, Baudin та Yagan, і рослини тричі нульових за гордеїнами ліній ідентифікували як такі, що містили 50 % кожної вихідної зародкової плазми. Ці тричі нульові за гордеїнами лінії перехресно схрещували і схрещували також з сортами дикого типу Hindmarsh та Commander. Потомство, що містило всі три нульові мутації, двічі зворотно схрещували з рослинами Sloop, Baudin, Hindmarsh та Commander та кількома гомозиготними лініями, які відтворені потомством однієї насінини з множини відібрали одну результируючу лінію, яка була продуктивною, і позначили її як ячмінь ULG3.1.

З результатів перехресних схрещувань з рослинами Sloop, Yagan та Baudin, виконали другий цикл перехресних схрещувань для комбінування генетичних оточень усіх трьох вихідних сортів, починаючи з рослин, кожна з яких містила три нульові мутації. З рослин F1 від перехресних схрещувань очікували всього потомства, що містило всі три мутації. Близько 1000 насінин F2 на породу висадили у борозни у польових умовах та відбирали рослини F2, які були відносно більш короткими і давали насіння F3, яке було більше, з добре наповненими колосками. Відбирали рослини як раннього, так і пізнього визрівання. У наступній генерації, що виростає у польових умовах, відбирали лінії, які додатково проявили відносно високий вміст у зерні амілази, відносно високий збиральний індекс та довжину колоса, оптимальну висоту (напівкарлик), відсутність вилягання та стійкість до захворювання мучнистою россою з 1500 родин вибрали близько 20 найкращих. Дані щодо 20 найкращих ліній представлені у табл. 5. Маса окремих насінин (маса зернівки) були значно покращені, перевершуючи масу ULG 3.0 до 41,8 мг/насінину, з найбільшою масою насінини 48,4 мг/насінину, яку спостерігали для лінії P12072-2. Це збільшення розміру насінин супроводжувалося збільшеним збиральним індексом, при вимірюванні ефективності утворення насіння близько 40 % мало найбільший збиральний індекс з 46,5 % виміряних у лінії P12124-1. Найголовніше, відсотковий вміст відсівів 2,8 мм також покращено з 53,5 % для ULG3.0 до більше ніж 80 %, з найбільшим значенням 97,3 % для лінії P12140-1.

Одну відібрану лінію зафіксували поколінням однієї насінини для отримання рослин, які гомозиготні за трьома нульовими алелями за Hor2-lys3a-Hor3, та позначили її ULG3.2. Параметр відсіву 2,8 мм для ULG3.2 знаходився у діапазоні 80-93 % у кількох повторностях, в яких ріст у польових умовах склав у порівнянні близько 97 % – для Sloop, 85 % – для Hindmarsh, 96 % – для сорту Oxford дикого типу та 98 % – для Maratime.

Середні маси насінин та їх товщина були такими: ULG2.0, 33,4 мг, 2,4 мм; ULG3.0, 41,8 мг, 2,5 мм; ULG3.2, 47,2 мг, 2,8 мм.

Таблиця 5

Другий відбір ліній ULG 3.2, червень 2012 р.

ID № рослини	Середня довжина пагона (см)	Середня довжина колоса (см)	Збиральний індекс (%)	Кіл-ть пагонів	Маса зернівки	% відсіву 2,8 мм
P12072-2	84,7	8,3	39,0 %	9	48,4	88,3
P12132-1	83,0	8,2	43,9 %	5	47,5	92,7
P12048-1	75,0	7,0	39,4 %	8	47,2	86,7
P12122-2	74,3	6,7	35,0 %	5	47,2	96,5
P12049-1	70,0	6,3	38,7 %	12	46,5	93,6
P12125-1	78,0	7,7	42,0 %	10	46,2	95,3
P12140-1	105,7	9,0	32,4 %	15	45,9	97,3
P12055-2	57,0	5,8	36,3 %	5	45,7	91,9
P12088-2	72,7	6,3	42,6 %	8	45,4	90,7
P12125-2	71,7	5,3	45,3 %	8	45,0	95,0
P12043-2	86,7	9,0	29,5 %	12	44,7	85,4
P12050-1	64,3	6,0	36,5 %	4	44,4	93,6
P12148-1	93,3	7,3	35,0 %	14	44,2	90,0
P12149-1	103,3	8,0	34,7 %	15	44,0	91,2
P12124-1	79,3	7,3	46,5 %	8	43,7	96,8
P12152-2	98,3	9,0	34,8 %	9	43,5	91,5
P12049-3	76,3	6,3	40,0 %	7	43,2	92,4
P12100-2	79,3	6,3	46,5 %	15	43,2	88,3
P12126-1	73,0	6,0	37,0 %	10	43,1	98,0
P12122-1	64,7	6,0	45,4 %	5	42,8	90,8
P12048-2	65,0	5,7	41,8 %	4	42,5	93,9
P12148-2	90,3	6,3	33,3 %	7	42,5	94,9
P12159-2	82,7	7,7	33,6 %	12	42,4	83,5
P12139-1	113,7	8,3	33,9 %	8	42,2	88,1
P12159-1	96,3	8,8	31,9 %	14	41,7	94,1
P12139-2	89,3	7,7	34,4 %	5	41,3	96,8
P12064-2	82,3	7,2	40,8 %	11	41,2	92,4
P12120-2	75,0	6,8	39,6 %	18	41,0	84,0
Критерій відбору		>4 <10	>35 %	5> 20	> 40	>80 %

Приклад 9 Вимірювання вмісту гордеїнів у тричі нульових мутантів ячменю

5 Визначення вмісту гордеїнів у муці з ULG3.0 методом мас-спектрометрії з моніторингом множинних реакцій (MRM-МС)

Для точного вимірювання вмісту гордеїнів використовували MRM-МС наступним чином. Перемелювали зерно або половини зерен для одержання цільнозернової муки, яка мала такий самий склад, що й цільне зерно. Поліпептиди проламінів з 20 мг зразків муки екстрагували з використанням 200 мкл розчину, що містив 55 % (об./об.) ізопропанолу та 2 % (мас./об.) дитіотреїтолу (ДТТ). Аліквоту екстракту, еквівалентну 5 мг муки, піддавали заміні буферного розчину на розчин 8М сечовини у 0,1 М трис-НСІ, рН 8,5, трьохкратним центрифугуванням з використанням фільтруючого елементу з відсіканням ММ 10 кДа Цистеїни у поліпептидах алкілювали додаванням 100 мкл 50 мМ йодацетаміду та інкубацією протягом 1 год при кімнатній температурі. Буферний розчин замінювали на 100 мкл 50 мМ бікарбонату амонію, рН 8,5, і поліпептиди розщеплювали 10 мкл (20 мкг) трипсину протягом 18 год при 37 °С. Пептиди збирали фільтрацією через фільтр на 10 кДа, висушували і розчиняли у 30 мкл 1 % (об./об.) мурашиної кислоти. Пептиди розділяли рідинною хроматографією на ВЕРХ Shimadzu Nexera з колонкою Phenomenex (Kinetex, 1,7 мкм, С18, 100 × 2,1 мм) з градієнтом від 5 % В до 40 % В протягом 10 хв при швидкості потоку 0,4 мл/хв.. Розчинник А представляв собою 0,1 % (об./об.) водну мурашину кислоту, розчинник В представляв собою 90 % (об./об.) ацетонітрил, що містив 0,1 % (об./об.) мурашину кислоту. Елюат після ВЕРХ безпосередньо подавали на мас-спектрометр і MRM-аналіз виконували на мас-спектрометрі 4000 QTRAP, націленому на

10

15

20

виявлення триптичних пептидів, що походять з гордеїв. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення Analyst v1.5 та програмного забезпечення MultiQuant v2.0.2 (інтегрування площ піків).

На фіг. 5 показані дані, отримані для вибраних В-гордеїв, С-гордею, D-гордею, гама-3-гордею (G3) та гамма-1-гордею (G1). На фіг. 5 представлена середня площа піка для кожного пептидного MRM-переходу, нормалізованого до вмісту у Sloop (100 %), для чотирьох повторних інжектів з кожної половини зерна з контрольного ячменю (дикий тип, сорт Sloop), одноступових за гордеями ліній: Risø 56, Risø 1508 та D-нульової лінії, що походить з сорту Ethiopia R118, двічі нульової за гордеями лінії ULG2.0 та тричі нульових ліній T2-4-8 та T2-6-A5 (відмічено колом). Для представлення кожної родини гордеїв вибирали по одному прототипному пептиду, а саме: для В-гордею, TLPTMCSVNPLYR (SEQ ID №: 48); для D-гордею, DVSPECRPVALSQVVR (SEQ ID №: 49); для С-гордею, LPQKPFVQQPF (SEQ ID №: 50); для G3-гордею, QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID №: 50), та для G1-гордею, CTAIDSIVHAIFMQQGR (SEQ ID №: 51). Ці пептиди зустрілися часто та були відносно розповсюджені у ячмені дикого типу, та виходячи з чого і були вибрані.

Показано, що тричі нульове зерно ULG3.0 з лінії T2-4-8 та другої тричі нульової лінії T2-6-A5 не мало рівнів, що детектуються, вмісту В-, С-, D- або, найбільш дивно, гама-1-гордею. Інакше кажучи, виявлено менше 1 % вмісту відносно дикого типу. Таким же чином, гама-2-гордеїн не виявлявся у зерні ULG3.0. В ньому містився відносно низький вміст гама-3-гордею (відмічено колом), що був присутнім на рівні близько 20 % у порівнянні з вмістом G3 у сорті Sloop Гама-3 гордеїн був міноним гордеєм; вміст гама-3 гордею у Sloop набагато менше ніж 1 % від загального вмісту гордеїв. Одноступові і двічі нульові зерна не накопичували відповідний гордеїн, наприклад, як очікувалось, Risø56 та ULG2.0 не накопичували В-гордеїни, а Risø1508 та ULG2.0, як очікувалось, не накопичували С-гордеїни У D-нульовому зерні проявився вміст В- та С-гордеїв дикого типу, але не накопичувався D-гордеїн.

Коли повторили аналіз з використанням кількох різних пептидних послідовностей, зокрема, пептиду D-гордею AQLAALPAMCR (SEQ ID №: 85), який являє собою білок D-гордею дикого типу, у напрямку С-кінця значно далі положення стоп-кодону у мутантному В-гордеїні, то отримували подібний результат (фіг. 6). У муці також був відсутнім авеніноподібний А-білок.

Було ясно, що зерно, отримане з тричі нульових за гордеями T2-4-8 та T2-6-A5, не містило рівні, що детектуються, В-, С-, D-гордеїв та вибраних гама-1 (P17990) та гама-2 гордеїв. Виявлення гама-1 та гама-2 гордеїв було найбільш неочікуваним для винахідників, так як невідомо, щоб тричі нульові мутантні лінії містили які-небудь мутації, які не могли би повністю заглушити відповідні гени.

Низький вміст гордеїв у зерні ULG3.0, визначений методом MRM, було підтверджено методом двомірного гель-електрофорезу, наступним чином. П'ятдесят мкг спирторозчинного білка з екстрактів муки з кожної нульової за гордеями лінії T2-4-8 та T2-6-A5, а також з контрольного ячменю сорту Risø 56, кожна проба з добавкою 1 мкг з поліпептидних стандартів BCA landmark, інгібітору трипсину сої і міоглобіну коня забарвлювали 0,006 % (мас./об.) колоїдного Кумасі G250 згідно Tanner et al (2013) та порівнювали зі стандартними білками 20, 30, 40, 50, 60, 80 та кДа (М; набір білків порівняння, Invitrogen). Плями вирізали з 2D-гелю та з контрольної лінії Risø 56 ідентифікували наступні білки методом мас-спектрометрії триптичних пептидів: С-гордеїн, гама-2-гордеїн (γ 2), гама-3-гордеїн (γ 3) та гама-1-гордеїн (γ 1). У гелях для зерна ULG3.0 ідентифікували ймовірні положення гама-1-, гама-2 та гама-3-гордеїв порівнянням з гелем для Risø 56. У муці з ULG3.0 виявили лише гама-3-гордеїн, решта три поліпептиду виявлені не були Концентрацію гама-3 гордею у кожній плямі вимірювали трьома методами: 1) як відсотковий вміст від усіх об'ємів плям для 50 мкг білка: середній вміст γ 3 у ULG3.0 склав $13,5 \pm 1,6$ м.ч.; 2) по відношенню до інтенсивності плями для 1 мкг BCA: середній вміст γ 3 у ULG3.0 склав $10,9 \pm 1,3$ м.ч.; 3) по відношенню до об'єму плями для 1 мкг BCA: середній вміст γ 3 у ULG3.0 склав $3,4 \pm 0,41$ м.ч.

Низький вміст гордеїв у зерні ULG3.0, визначений методом MRM, було додатково підтверджено методом ІФА, наступним чином. Двадцять мг зразків цілюзернової муки або ендосперму половин насінин подрібнювали і тричі промивали 0,5 мл води якості MilliQ струшуванням на швидкості 30/сек протягом 3×30 сек у 96-луночному вібраційному млині (Retsch GmbH, Rheinische) та центрифугували при 14000 об/хв протягом 5 хв. Проламіни із зразків муки екстрагували у спиртовий розчин, що містив 0,5 мл 50 % (об./об.) ізопропанолу/1 % (мас./об.) ДТТ, для контрольних ліній Sloop, Risø56, Risø1508 та для ULG2.0, тричі нульових за гордеями ліній T1, T2 і T3 та потомства покоління однієї насінини з ліній T2-4-8 та T2-6-A5. Концентрації білків визначали у відповідності з методом Bradford (1976) і для цього 40 нг (1900 нг для тричі нульових ліній зерна) спирторозчинного білка, розбавляли розчином, що містив

розчинники ELISA systems з постійним надлишком 0,2 мМ H₂O₂, що додавався для видалення будь-яких залишків ДТТ з вихідного екстракту. Розчини розбавлених білків добавляли у лунки планшета ІФА (ELISASystems, м Вінзор, Квінсленд, Австралія), промивали та проявляли при 37 °С протягом 15 хвилин, згідно інструкцій виробника. Кількість гордеїну у контрольних екстрактах калібрували у порівнянні зі стандартом 0-50 нг загального білка Sloop. Вміст гордеїну у тричі нульових лініях калібрували у порівнянні зі стандартом 0-5 нг загального білка ULG2.0. Гордеїни Sloop та ULG2.0 отримували, як описано авторами Tanner et al (2010).

За результатами методу ІФА загальний вміст гордеїнів двічі нульових зразків муки склав 2,9 % у порівнянні з сортом Sloop дикого типу, тоді як вміст залишкових гордеїнів у двох відібраних тричі нульових за гордеїнами лініях, T2-4-8 та T2-6-A5, склало 3,9 та 1,5 мкг/г (мільйонних часток, м.ч.; табл. 6), обидва значення були значно нижче законодавчо дозволеного рівню FSANZ, рівного 20 м.ч для глютену у безглютеновому харчовому продукті, та приблизно у 15000 раз нижче, ніж у зерні сорту Sloop дикого типу.

Визначення вмісту гордеїнів у пиві з ULG3.0 методом мас-спектрометрії з моніторингом множинних реакцій (MRM-MC).

Вміст гордеїнів у пиві, звареному із зерна ячменю ULG3.0, вимірювали методом MRM-MC, що виявив специфічні пептидні послідовності з використанням методів, описаних у Прикладах 3 та 4, з незначними модифікаціями. Ці дані представлені на фіг. 7. Результати аналізів показали відсутність авеніноподібного А-білка, В1- і В3-гордеїнів, D-гордеїну та зменшений вміст гама-1-гордеїну і гама-3-гордеїну, оскільки вони не були виявлені, як такі, що перевищили фоновий шум при проведенні мас-спектрометрії (фіг. 7). Ці аналізи також показали відсутність С-гордеїну.

Таблиця 6

Зведені дані щодо вмісту гордеїнів в одно-, двічі та тричі нульових лініях

Лінія	мг гордеїну/ г муки	% від Sloop
Sloop	56,6±3,3	100 %
Risø56	33,3±1,1	58,8 %
Risø1508	4,9±0,26	8,7 %
ULG2.0	1,67±0,07	2,9 %
T2-4-8 (ULG3.0)	0,0039±0,0017	0,007 %
T2-6-A5	0,0015±0,0004	0,0027 %

Визначення вмісту гордеїнів у муці з ULG3.1 та ULG3.2 0 методом MRM-MC

Вміст гордеїнів у муці, одержаній перемелюванням зерен лінії ULG3.1 та 10 перспективних ліній ULG3.2, визначали методом MRM-MC, описаним для зерна ULG3.0. Половини зерен перемелювали у муку і білки проламіни з 20 мг муки (n=4 повторності) екстрагували, алкілювали, розщеплювали трипсином та аналізували методом MRM-MC, як описано вище. Дані відображені на фіг. 8, які показують середню площу піка для кожного пептиду (сума трьох MRM-переходів) з кожної половини зерна ULG3.1 та ліній, що виникли від подвійного перехресного схрещування вихідних ліній, позначених 043-2 – 148-2. Ці дані відображені у порівнянні з контрольним ячменем (сорт дикого типу Sloop, Baudin, Commander та Hindmarsh) і тричі нульовою лінією T2-4-8. Площа піка показана для вибраного прототипного пептиду, представника кожної родини гордеїнів, № доступу у базі даних Uniprot та амінокислотні послідовності наступні:

A-F2EGD5_QQCCQPLAQISEQAR (SEQ ID №: 52; з F2EGD5, центральний в авеніноподібному А-білку)

B1-Q40020_VFLQQQCSPVR (SEQ ID №: 53; близький до N-кінця В1-гордеїну)

B3-Q4G3S1_VFLQQQCSPVPMPQR (SEQ ID №: 54)

C-Q40055_QLNPSHQELQSPQQPFLK (SEQ ID №: 55; близький до N-кінця С-гордеїну)

D-Q84LE9_ELQESSLEACR (SEQ ID №: 56; з Q84LE9, перед стоп-кодоном на Y150)

G1-P17990_APFVGVVTGVGGQ (SEQ ID №: 57; з P17990, С-кінцевий пептид) та

G3-P80198_QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID №: 58; з P80198, центральний у γ3-гордеїні).

Вміст D-гордеїну в зернах подвійного перехресного схрещування вихідних ліній, показаний на фіг. 8, був подібний до вмісту у зерні з ULG2.0 та у тричі нульових за гордеїнами лініях T2-4-8 і T2-6-A5, близько нуля, що підтверджує спостереження, зроблене при використанні 2D-ПААГ-електрофорезу, коли D-гордеїни не виявили в зерні ліній T2-4-8 і T2-6-A5. Вміст гама-1-гордеїну у цьому зерні двічі перехресно схрещених вихідних ліній, був подібний з вмістом у ULG2.0 та у тричі нульових за гордеїнами лініях T2-4-8 і T2-6-A5. Кілька ліній ULG3.2 мали близький до

нульового вмісту пептиду APFVGVTGVGGQ (SEQ ID №: 59). Гама-1-гордеїн не виявлявся методом 2D-ПААГ-електрофорезу ліній T2-4-8 і T2-6-A5. Вміст гама-3-гордеїну в зернах подвійного перехресного схрещування вихідних ліній, був також подібним з вмістом у ULG2.0 та у тричі нульових за гордеїнами лініях, за виключенням лінії 124.1 (ULG3.2), в якій він був дуже

низьким. Гама-3-гордеїн також виявлявся зі зменшеним вмістом методом 2D-ПААГ-електрофорезу ліній T2-4-8 і T2-6-A5.

Цікаво, що виявлена синергічна дія мутацій *Hor2* та *lys3a* щодо зменшення вмісту D-гордеїнів у ULG2.0, не дивлячись на те, що була відсутня мутація *Hor3* (D-гордеїн). Подібним чином, наявність усіх трьох мутацій (*Hor2-lys3a-Hor3*) мала синергічну дію щодо зниження накопичення гама-1- та гама-2-гордеїнів, як визначено за вмістом пептидів вище.

Приклад 10 Створення позбавлених оболонок тричі нульових мутантів ячменю

Усі зерна ячменю селекційних варіантів ULG3.0, ULG3.1 та ULG3.2 були з оболонками, що є перевагою для пивовареної промисловості, оскільки відпрацьоване лушпиння утворює фільтруючий шар під час фінальних стадій фільтрації суслу (зціджування). Однак, оболонки зерен ячменю мають велику кількість дрібних силікатних голок і тому оболонки перед споживанням людьми необхідно видаляти лушпинням. Альтернативний підхід полягає в отриманні позбавленого оболонок зерна генетичними способами. Виходячи з цього, рослини ULG3.0 схрещували з позбавленим оболонок різновидом ячменю, позначеним *Barleymax II* (WO2011/011833), та вибраною позбавленою оболонки тричі нульовою за B-, C-, D-гордеїнами мутантною (*Hor2-lys3a-Hor3*) рослиною, яка була лінією дикого типу за геном *SSIIa*.

Кілька тричі нульових за гордеїнами позбавлених оболонок селекційних варіантів F6 (наприклад, A7_1), що містили менше 0,1 м.ч загальної кількості гордеїну у муці, вибрали після трьох циклів отримання покоління однієї насінини.

Приклад 11 Мутагенез ячменю

Для виділення мутантів за вибраними генами у ячмені проводили мутагенез з етилметансульфонатом (EMS), описаний автором Caldwell (2004). Близько 45000 (1,5 кг) насінин ULG3.0 використовували для мутагенезу наступним чином: зерно замочували у 2,5 л дистильованої води протягом 4 год при кімнатній температурі з аерацією. Воду міняли кожну годину під час замочування. Потім насіння інкубували у 2,5 л свіжоприготовленого 30 мМ EMS у 0,1 М фосфатному буферному розчині (pH7) протягом 16 год при кімнатній температурі з аерацією. Потім насіння промивали 2,5 л 100 мМ розчином тіосульфату натрію протягом 10 хв при кімнатній температурі. Промивання тіосульфатом повторювали і потім зерна ретельно ополіскували 2 × 2 л дистильованої води протягом 30 хв при кімнатній температурі з аерацією. Насіння висушували під потоком повітря протягом ночі на абсорбентному фільтрувальному папері перед висаджуванням на наступний день у польових умовах. Основну масу насіння M2 збирали, об'єднували та аналізували на наявність мутантів. Після такої обробки мутаційна частота склала приблизно 1 мутант у гені, що представляє інтерес, на 1000 насінин. Насіння піддавали скринінгу на втрату експресії гама-3 гордеїну методом дот-блотингу для половин насінин з використанням специфічного моноклонального антитіла до гама-3 гордеїну, та з кількох десятків тисяч насінин M2 ідентифікували 40 насінин, які дали негативний сигнал. Відсутність гама-3 гордеїну в цих зернах підтвердили методом Вестерн-блотингу з використанням моноклонального антитіла і мас-спектрометрією на специфічний пептид (SEQ ID №:58). Половини зерен, що містили ембріон з кожного негативної зернини, помістили на середовище для забезпечення проростання Ембріони більшості половин зерен не проросли, але кілька – проросли.

Приклад 12 Виробництво пива з ячменю з низьким вмістом гордеїнів

Випробування з варіння пива проводили з використанням солоду, одержаного із зерна ULG2.0 стандартними методиками, і результати порівнювали з контрольним сортом ячменю дикого типу *Gairdner*. *Gairdner* являє собою високоврожайний напівкарликовий 2-рядний різновид ячменю середньопізнього визрівання, що повсюдно вирощують у всіх областях вирощування зернових культур Австралії. При сприятливих умовах він продукує належний розмір зерен, які дають помірні рівні екстракції, здатність до ферментації та діастатичну активність і, тому, є промисловим "стандартом", таким чином він є ідеальним для використання в якості контролю для оціночних випробувань при варінні пива Солод, одержаний з ULG2.0, мав трохи більш високий вміст вологи рівний 5,7 %, у порівнянні з солодом із *Gairdner* (5,0 %), та значно відрізнявся від солоду з *Gairdner* зовнішнім виглядом, вираженим в тому, що зерно виглядало вищербленим та зморщеним. Діастатична активність (ДА) солоду з ULG2.0 склала 54WK, набагато нижче, ніж ДА для *Gairdner* 299WK. Осолоджений ячмінь у більшості випадків мав ДА щонайменше 250KW. Тим не менш, солод з ULG2.0 був негативним за крохмалем через 20 хв тривалості затирання та досяг результату за LG рівного 1,7° Плато.

Солод перемелювали за два проходи через 2-ролерний млин та досягали задовільний ступінь дроблення зерна. Для цього солоду краще всього би підійшло більш комплексне перемелювання у шестиролерному млині через морфологію його зерна. В альтернативному варіанті для відділення сусла зручніше було би використовувати молотковий млин у поєднанні з фільтром для затору, ніж фільтраційний чан. Подрібнений продукт затирали стандартними способами при початковій температурі 65 °C протягом 20 хв, потім 74 °C протягом 5 хв з додаванням додаткової промивної води. Загалом, зморшкувата морфологія солоду з ULG2.0 створила складність для задовільного подрібнення та затирання у порівнянні зі звичайним солодом. Затерті продукти потім фільтрували, при цьому зморшкувата морфологія ULG2.0 знову викликала ускладнення. Фільтруючий шар розвалився на частини з утворенням каналів, тому стало потрібним зупинити стікання та повторно розрихлити фільтруючий шар. Через неефективне подрібнення під час процесу фільтрування значна кількість потенційного екстракту було втрачено, що позначилося на досягненні загального значення у котлі 10,96° та 11,12° Плато, тоді як метою було досягти значення 14° Плато. Значення pH, кольоровості за EBC та рівню бета-глюкану були прийнятними. Недостатність подрібнення також значила, що не відбулося ефективне утворення шару лушпиння, що діяв як фільтруючий матеріал, що викликало зниження якості очікуваного екстракту. Прозорість фільтрату спочатку була дуже каламутною через погане утворення шару, хоча прозорість сусла покращилася до прийнятної після одержання 30 л фільтрату.

Результуюче сусло ферментували дріжджовим штамом *Saccharomyces uvarum* A при 18,5 °C протягом 120 год. Профіль ферментації був нормальним, була відсутня тривала лаг-фаза на початку ферментації, хоча значні рівні діацетилю залишалися навіть після заданою тривалості діацетильної фази відпочинку, після завершення ферментації була досягнута необхідна густина. Діацетильна пауза, при якій пиво залишають при підвищених температурах ферментації перед охолодженням пива до 0 °C, проводиться для того, щоб дозволити дріжджам реабсорбувати та метаболізувати діацетил. У більшості випадків вкінці ферментації потрібно 24 год., щоб дати дріжджам час для руйнування цього продукту. Цього не відбулося при двох пробних варках пива з ULG2.0. Ізомеризований екстракт хмелю додавали у концентрації 30 мг/л і рідину очищували додаванням силікатного гідро гелю. Готове освітлене пиво мало більш низьку фізичну стабільність, ніж контрольне пиво. Початкове помутніння при охолодженні вважалось високим, а помутніння при примусовому охолодженні вийшло за межі нормальної специфікації. Тим не менш помутніння при охолодженні не привело до утворення зважених часток.

Готове пиво піддали органолептичному аналізу групою навчених пивоварів та, не дивлячись на складність у процесах подрібнення та фільтрування, результати виявилися неочікувано добрими, приймаючи до уваги питання, пов'язані з ефективністю зброджування цього солоду ДМС (диметилсульфід) був переважаючим у смаку і ароматі; однак це не виглядало об'єктивним. Наявність ДМС часто вважається дефектом смаку і аромату в австралійському пиві, але у більшості випадків є загальноприйнятим в європейських, особливо німецьких сортах пива. Коментарі пивоварів були такими, що види пива з ULG2.0 не були надто несхожими на контрольні види пива та що вони були дуже прийнятними в якості пива і нагадували німецькі сорти пива. Не було виражених "зернистих" або "зернових" типів смаків і ароматів та не було пекучості і в'язучого смаку для пива з ULG2.0, як звичайно відбувається для комерційних видів пива, які просуваються на ринку як "безглютенові". Загальний смаковий та ароматичний букет був прийнятним та достатньо добрим.

Із зерна ячменю ULG3.0 таким самим способом як для зерна ULG2.0 було приготоване пиво, а також воно було приготоване із зерна ячменю ULG3.2. Осолоджування зерна ULG3.0 було кращим відносно зерна ULG3.0, головним чином завдяки етапу подрібнення, покращеному через те, що зерно було менш зморшкуватим. Пиво, приготоване із зерна ULG3.0, мало кращу якість з прийнятним та достатньо добрим смаком і ароматом. Покращена морфологія зерна (розмір та форма) зерна з ULG3.2 передбачає більш легке подрібнення і фільтрування у процесі варіння пива, забезпечуючи одержання пива із загальним вмістом гордеїнів менше 1 м.ч.

Приклад 13 Виробництво харчових продуктів з використанням ячменю ULG

З використанням ліній ячменю ULG3.0 і ULG3.2 випікали два малоформатних хліба (10 г). Малоформатні буханки випікали з метою випробування, але цей спосіб може легко бути масштабованим до комерційних обсягів. Один хліб готували зі 100 % вмістом ячмінної муки з ULG в якості мучного інгредієнта, перемеленого, як описано вище, тоді як другий хліб готували із суміші 30 % муки та 70 % комерційної безглютенової муки, такої як рисова мука, в якості мучного інгредієнта Муку (13,02 г) та інші інгредієнти замішували у тісто для визначення часу

пікового тістоутворення у міксографі 35-g. Рецепт, що використовувався, заснований у кожному випадку на 13,02 г муки, такий: мука 100 %, сіль 2 %, сухі дріжджі 1,5 %, рослинне масло 2 % та поліпшувач 1,5 %. Рівень додавання води заснований на величинах абсорбції води для мікромішалки з місильним органом Z-подібної форми, який може коректуватися при отримання

5 повного рецепта Формування та укладення проводилися у двостадійні етапи з перевіркою при 40 °C та вологістю у приміщенні 85 %. Випікання проходило у печі Rotel протягом 14 хв при 190 °C.

Обидва хліба мали вміст глютену менше 20 м.ч та були придатними для споживання людьми, суб'єктами з ЗЦ.

10 Фахівцям у цій галузі слід розуміти, що для цього винаходу можуть бути створені багаточисельні варіації та/або модифікації, як показано у спеціальних варіантах реалізації винаходу, без відступу від суті та обсягу цього винаходу, як було розширено описано. Отже, ці варіанти реалізації винаходу повинні розглядатися у всіх відношеннях як ілюстративні та не обмежуючі.

15 У цій заявці заявлений пріоритет за заявкою AU 2013902140, поданою 13 червня 2013 р., та AU 2013902565, поданій 11 липня 2013 р., повний зміст обох заявок включено у цей документ як посилання.

Усі публікації, що обговорюються та/або згадуються у цьому документі, включені у цей документ у повному обсязі.

20 Будь-яке обговорення документів, актів, матеріалів, пристроїв, статей тощо, які було включені у даному описі, зроблено виключно з метою забезпечення контексту даного винаходу. Не слід приймати як припущення, що будь-яке або всі з цих положень не утворюють частину попереднього рівню техніки або не становили звичайний відомий рівень техніки у галузі, що відноситься до цього винаходу, як якщо б вони не існували до пріоритетної дати кожного пункту

25 формули винаходу цієї заявки.

ПОСИЛАННЯ

Abdullah et al (1986) *Biotechnology* 4:1087.

Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15: 251-258.

Anderson et al (2000) *Nature Medicine* 6:337-342.

30 Anderson et al (2013) *Genome* 56:179-185.

Bibikova et al (2001) *Mol Cell Biol* 21: 289-287.

Bibikova et al (2002) *Genetics* 161:1169-1175.

Bourque (1995) *Plant Sci* 105: 125-149.

Brandt et al (1990) *Eur J Biochem* 194:499-505.

35 Brennan et al (1998) *J Cereal Sci* 28:291-299.

Caldwell (2004) *The Plant Journal* 40:143-150.

Cameron-Mills et al., (1998). *Plant Mol Biol* 11: 449-461.

Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.

Catassi et al (1994) *Lancet* 343:200-203.

40 Certo et al (2012) *Nat Methods* 8:941-943.

Cheng et al (1996) *Plant Cell Rep* 15:653-657.

Clapp (1993) *Clin Perinatol* 20:155-168.

Colgrave et al., (2012) *J Proteome Res* 11: 386-396.

Comai et al (2004) *Plant J* 37: 778-786.

45 Curiel et al (1992) *Hum Gen Ther* 3:147-154.

Davies et al (1993) *Cell Biology International Reports* 17:195-202.

De Anglis et al (2007) *J Food Protection* 70:135-144.

Doll (1983) *Barley seed proteins and possibilities for their improvement B "Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritional Value"*, Gottschalk W, Muller HP (eds). Martinus Nijhoff, The Hague:207-223.

50 Doll et al (1973) *Barley Genetics Newsletter* 3:12-13.

Dostalek et al (2006). *Food Additives and Contaminants* 23:1074-1078.

Doyon et al (2010) *Nat Methods* 7:459-460.

Doyon et al (2011) *Nat Methods* 8:74-79.

55 Eglitis et al (1988) *Biotechniques* 6:608-614.

Fasoli et al., (2010). *J Proteome Res* 9: 5262-6269.

Field et al (1982) *Theoretical and Applied Genetics* 62:329-336.

Fowell et al (2006) *Qjm-an International Journal of Medicine* 99:453-460.

Fujimura et al (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2:74.

60 Graham et al (1973) *Virology* 54:536-539.

- Grant et al (1995) *Plant Cell Rep* 15:254-258.
- Green (2009) *Journal of the American Medical Association* 302:1225-1226.
- Green and Jabri (2006) *Annual Review of Medicine* 57:207-221.
- Groenen et al (1993) *Mol Microbiol* 10:1057-1065.
- 5 Gu et al (2003) *Genome* 46:1084-1097.
- Guo et al (2010) *J Mol Biol* 400:96-107.
- Haft et al (2005) *Computational Biology* 1(6):e60.
- Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- Hausch et al (2002) *Gastroenterology* 122:A180.
- 10 Henikoff et al (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Hoe et al (1999) *Emerg Infect Dis* 5:254-263.
- Ishino et al (1987) *J Bacteriol* 169:5429-5433.
- Janssen et al (2002) *OMICS J Integ Biol* 6:23-33.
- Jaradat (1991) *Theor Appl Genet* 83:164-168.
- 15 Kahlenberg et al (2006) *European Food Research Technology* 222:78-82.
- Kasarda et al (1984) *PNAS* 81:4712-4716.
- Kikuchi et al., (2003). *Theor Appl Genetics* 108: 73-78.
- Kim et al (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1156-1160.
- Kim et al (2012) *Genome Res* 22:1327-1333.
- 20 Kozziel et al (1996) *Plant Mol Biol* 32:393-405.
- Kreis and Shewry (1989) *BioEssays* 10:201–207.
- Kreis et al (1983) *Cell*: 34:161-167.
- Kristoffersen et al., (2000) *Electrophoresis* 21: 3693-3700.
- Kupper (2005) *Gastroenterology* 128:S121-127.
- 25 Lanzini et al (2009) *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29:1299–1308.
- Lee et al (2007). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 20:423-430.
- Lu et al (1993) *J Exp Med* 178:2089-2096.
- Marti et al (2005) *J Pharmacol Exp Therapeut* 312:19-26.
- Masepohl et al (1996) *Biochim Biophys Acta* 1307:26-30.
- 30 McConnell Smith et al (2009) *PNAS* 106:5099-5104.
- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Miller et al (2007) *Nat Biotechnol* 25:778-785.
- Mojica et al (1995) *Mol Microbiol*.17:85-93.
- Mojica et al (2000) *Mol Microbiol* 36:244-246.
- 35 Moravcova et al (2009). *Journal of Chromatography a* 1216:3629-3636.
- Nakata et al (1989) *J Bacteriol* 171:3553-3556.
- Ohlund et al (2010). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 23:294-300.
- Pasquinelli et al (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Perriman et al (1992) *Gene* 113: 157-163.
- 40 Picariello et al (2011). *Food Chemistry* 124:1718-1726.
- Ramirez et al (2012) *Nucleic Acids Res* 40:5560-5568.
- Rubio-Tapia et al (2010). *American Journal of Gastroenterology* 105:1412-1420.
- Senior (1998) *Biotech Genet Engin Revs* 15: 79-119.
- Shan et al (2002). *Science* 297:2275-2279.
- 45 Shewry (1995) *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70:375-426
- Shewry and Halford (2002) *Journal of Experimental Botany* 53:947–958.
- Shewry and Tatham (1990) *Biochemical Journal* 267:1-12.
- Shewry, et al., (1999) *The prolamins of the Triticeae In Seed Proteins*, Kluwer: London, 1999; pp 35-78.
- 50 Shippy et al (1999) *Mol Biotech* 12: 117-129.
- Skovbjerg et al (2005) *Diabetologia* 48:1416-1417.
- Skovbjerg et al., (2004). *Biochim et Biophys Acta-Mol Bas.of Dis* 1690:220-230.
- Slade and Knauf (2005) *Transgenic Res* 14: 109-115.
- Smith et al (2000) *Nature* 407: 319-320.
- 55 Stepniak et al (2006) *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 291:621-629.
- Szczepek et al (2007) *Nat Biotechnol* 25:786-793.
- Tanner et al (2013) *Plos One*: 8:e56456.
- Tanner et al., (2010). *Aliment Pharmacol Ther* 32: 1184-1191.
- Tjon et al (2010) *Immunogenetics* 62:641-651.
- 60 Toriyama et al (1986) *Theor Appl Genet* 205:34.

- Tye-Din et al (2010) Science Translational Medicine 2:41-51.
 van Embden et al (2000) J Bacteriol 182:2393-2401.
 Wagner et al (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:6099-6103.
 Wang et al (2012) Genome Res 22:1316-1326.
 5 Waterhouse et al (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959-13964.
 Wijngaard and Arendt (2007) Brewer & Distiller International 3: 31-32.
 Wild et al (2010). Alimentary Pharmacology & Therapeutics 32:573-581.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Науково-промислова дослідницька організація Співдружності
 Зернова науково-дослідницька корпорація

<120> Ячмінь з дуже низьким вмістом гордеїнів

<130> 515268

<150> AU 2013902140

<151> 2013-06-13

<150> AU 2013902565

<151> 2013-07-11

<160> 85

<170> Версія PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> Білок

<213> Triticum aestivum

<400> 1

Glu Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Trp Gln Pro
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 3

Glu Pro Glu Gln Pro Ile Pro Glu Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 17

<212> Білок

<213> Triticum aestivum

<400> 4

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ser

<210> 5

<211> 15

<212> Білок

<213> Triticum aestivum

<400> 5

Gln Gln Cys Cys Gln Pro Leu Ala Gln Ile Ser Glu Gln Ala Arg
1 5 10 15

<210> 6
<211> 11
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 6

Met Val Leu Gln Thr Leu Pro Ser Met Cys Arg
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 7

Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 8

Phe Val Gln Pro Gln Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His Gln Pro
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 9

Tyr Pro Glu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr
1 5 10 15

<210> 10
<211> 19
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 10

Leu Glu Arg Pro Gln Gln Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln
1 5 10 15

Gln Pro Pro

<210> 11
<211> 18
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 11

Leu Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His
1 5 10 15

Gln Pro

<210> 12
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Secale cereale

<400> 12

Gln Gln Pro Phe Pro
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Secale cereale

<400> 13

Gln Gln Gln Phe Pro
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Secale cereale

<400> 14

Leu Gln Pro Phe Pro
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Secale cereale

<400> 15

Gln Leu Pro Phe Pro
 1 5

<210> 16
 <211> 16
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 16

Arg Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 16
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 17

Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 18

Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
 1 5 10 15

```

<210> 19
<211> 12
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare
<400> 19
val val Asp Gln Gln Leu val Gly Gln Leu Pro Trp
1          5          10

<210> 20
<211> 12
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare
<400> 20
Gln Leu val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
1          5          10

<210> 21
<211> 11
| <212> Білок
| <213> Hordeum vulgare
<400> 21
Gln Leu val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
1          5          10

<210> 22
<211> 13
| <212> Білок
| <213> Hordeum vulgare
<400> 22
Leu val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met
1          5          10

<210> 23
<211> 11
| <212> Білок
| <213> Hordeum vulgare
<400> 23
Leu val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
1          5          10

<210> 24
<211> 10
| <212> Білок
| <213> Hordeum vulgare
<400> 24
Leu val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
1          5          10

<210> 25
<211> 12
| <212> Білок
| <213> Hordeum vulgare
<400> 25
val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met

```

```

1             5             10
<210> 26
<211> 10
| <212> Білок
  <213> Hordeum vulgare
<400> 26
Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
1             5             10
<210> 27
<211> 15
| <212> Білок
  <213> Hordeum vulgare
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> піроглутамінова кислота
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> ГексНАС
<400> 27
Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg Leu Glu Gly Ser
1             5             10             15
<210> 28
<211> 26
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare
<400> 28
Val Val Arg Gln Tyr Glu Gln Gln Thr Glu Val Pro Ser Lys Gly Gly
1             5             10             15
Ser Phe Tyr Pro Gly Gly Thr Ala Pro Pro
             20             25
<210> 29
<211> 15
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare
<400> 29
Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe Lys Val Val Gly Ser
1             5             10             15
<210> 30
<211> 10
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare
<400> 30
Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe
1             5             10
<210> 31
<211> 16
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

```

<400> 31

Ala Ile Val Met Gln Gln Gln Val Gln Gln Gln Val Gly His Gly Phe
1 5 10 15

<210> 32

<211> 19

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 32

Leu Glu Arg Pro Gln Gln Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln
1 5 10 15

Gln Pro Pro

<210> 33

<211> 13

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 33

Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln Gln Pro Pro
1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 34

Leu Gln Gln Leu Gly Gln Gly Met Pro Ile Gln Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 35

Val Val Gly Ser Leu Val Ile Gln Thr
1 5

<210> 36

<211> 19

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 36

Leu Gln Gln Pro Gln His Gln Phe Pro Gln Pro Thr Gln Gln Phe Pro
1 5 10 15

Gln Arg Pro

<210> 37

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 37

Tyr Pro Glu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr
1 5 10 15

<210> 38
<211> 12
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 38

Gly Val Val Gln Pro Gln Gln Leu Ala Gln Met Glu
1 5 10

<210> 39
<211> 17
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> піроглутамінова кислота

<400> 39

Gln Pro Gln His Gln Phe Pro Gln Pro Thr Gln Gln Phe Pro Gln Arg
1 5 10 15

Pro

<210> 40
<211> 14
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 40

Phe Val Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Ile Thr Arg
1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 41

Phe Val Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Ile
1 5 10

<210> 42
<211> 18
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 42

Leu Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His
1 5 10 15

Gln Pro

<210> 43
<211> 17
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 43

Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His Gln
1 5 10 15

Pro

<210> 44

<211> 12

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 44

Val Gln Val Gln Ile Pro Phe Val His Pro Ser Ile
1 5 10

<210> 45

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 45

Ser Phe Gly Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Val Met Arg
1 5 10 15

<210> 46

<211> 28

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 46

Ile Ile Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln
1 5 10 15

Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln Gln Pro
20 25

<210> 47

<211> 14

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> dansyl-glutamic acid (DEA)

<400> 47

Ile Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Pro
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 48

Thr Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro Leu Tyr Arg
1 5 10

<210> 49

<211> 16

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 49

Asp Val Ser Pro Glu Cys Arg Pro Val Ala Leu Ser Gln Val Val Arg
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 50

Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu Gln Ser Arg
1 5 10 15

<210> 51

<211> 17

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 51

Cys Thr Ala Ile Asp Ser Ile Val His Ala Ile Phe Met Gln Gln Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 52

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 52

Gln Gln Cys Cys Gln Pro Leu Ala Gln Ile Ser Glu Gln Ala Arg
1 5 10 15

<210> 53

<211> 11

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 53

Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Arg
1 5 10

<210> 54

<211> 15

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 54

Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Pro Met Pro Gln Arg
1 5 10 15

<210> 55

<211> 18

<212> Білок

<213> Hordeum vulgare

<400> 55

Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser Pro Gln Gln Pro Phe
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 56
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 56

Glu Leu Gln Glu Ser Ser Leu Glu Ala Cys Arg
 1 5 10

<210> 57
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 57

Ala pro phe val Gly val val Thr Gly val Gly Gly Gln
 1 5 10

<210> 58
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 58

Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu Gln Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 59

Ala pro phe val Gly val val Thr Gly val Gly Gly Gln
 1 5 10

<210> 60
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 60
 gacacatatt ctgccaaaac ccc

23

<210> 61
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 61
 acgagggcga cgattaccgc

20

<210> 62
 <211> 25
 <212> ДНК

<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	62	
	gagatcaatt cattgacagt ccacc	25
<210>	63	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	63	
	cttgtcctga ctgctgcgga gaaa	24
<210>	64	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	64	
	gcaacaagga cactaccsaа gtatg	25
<210>	65	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	65	
	gctgacaatg agctgagaca thtag	25
<210>	66	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	66	
	ggcaatacga gcagcaaac	19
<210>	67	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	67	
	cctctgtcct ggttggtgtc	20
<210>	68	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		

<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	68	
	tcgcaggatc ctgtacaacg	20
<210>	69	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	69	
	саасаатгаа гассттсстс	20
<210>	70	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	70	
	сгaгаaggta ccattactcc ag	22
<210>	71	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Штучна послідовність	
<220>		
<223>	Олігонуклеотидний праймер	
<400>	71	
	agtaacaatg aaggtcctc g	21
<210>	72	
<211>	2838	
<212>	ДНК	
<213>	Hordeum vulgare	
<400>	72	
	gacacatatt ctgccaaaac cccagaaca taatcacttc tcgtagatga agagaacaga	60
	ccaagataca aacgtccacg cttcagcaaa cagtacccca gaactaggat taagccgatt	120
	acgcggcttt agcagaccgt ccaaaaaaac tgttttgcaa agctccaatt cctccttgct	180
	tatccaattt cttttgtgtt ggcaaaactgc acttgtccaa ccgattttgt tcttcccgtg	240
	tttcttctta ggctaactaa cacagccgtg cacatagcca tgggtccgga tcttcacctc	300
	gtccctataa aagcccagcc aatctccaca atctcatcat caccgagaac accgagaacc	360
	acaaaaactag agatcaattc attgacagtc caccgagatg gctaagcggc tggctcctctt	420
	tgtggcggta atcgtcgccc tcgtggctct caccaccgct gaacgtgaga tcaatgggaa	480
	caacattttt cttgatagcc gctctaggca gctacagtgt gagcgcgagc tccaggagag	540
	ctcgtctcag gcgtgccggc gggtcgtgga ccaacagctg gttggccagc tgccatggag	600
	cacggggctc cagatgcagt gctgccagca gcttcgggac gtcagccccg agtgccgccc	660
	cgtcgccctc agccaggctg tgaggcaata cgagcagcaa accgaggtgc catccaaggg	720
	aggatccttc taccggggcg ggaccgcacc gccgctgcaq caaggaggat ggtggggaac	780

ctctgtaaaa	tggtactacc	cagaccaa	ac	ttcttcgcaa	cagtcatggc	aagggaaca	840
agggtaccac	caaagcgtaa	cttcttccca	gcagccagga	caagggcagc	aagggtccta		900
cccagggtca	actttcccg	agcagccagg	acaaggacaa	caaccaggac	agaggcagcc		960
atggtcttat	ccaagtgcaa	ctttcccaca	acagccaggg	caagggaag	ggcaacaagg		1020
gtactaccca	ggcgcaactt	ccctgctgca	gccaggacaa	gggcaacaag	ggccctacca		1080
gagtgaact	tctccacagc	agccaggaca	aggacaggga	caccaagaga	cctatcaatt		1140
tgcaacttcc	ccgcatcagc	caggacaatg	gcaacaacca	ggacaagggc	aacaagggtg		1200
ctacccaagt	gtaacttctc	cacaacagtc	gggacaaggg	caaacagggt	accaagtac		1260
aacttctcca	caacaatcgg	ggcaaggga	acagctggga	caagggaac	aaccaggaca		1320
agggaacaa	gggtaccca	gtgcaacttt	tccacaacag	ccaggacaat	ggcaacaagg		1380
gtcctaccca	agtacaactt	ctccgcagca	gtcaggacaa	gggcaacaag	ggtacaacc		1440
aagtggaact	tctacgcagc	agccgggaca	agtgaacag	ttgggacaag	ggcaacaagg		1500
gtactaccca	attgcaactt	ctccgcagca	gccaggacaa	gggcaacagc	taggacaagg		1560
gcaacaacca	ggacatgggc	aacagctagt	gcaaggga	caacaaggac	aagggaaca		1620
aggacactac	ccaagtatga	cttctccgca	ccaacaggga	caaggga	aaggatacta		1680
ccaagtgca	atttctccg	agcagtcagg	acaaggacaa	caaggatacc	agcctagtgg		1740
agcttcttca	cagggggtcgg	tgcaaggggc	gtgccagcac	agcacatctt	ctccgcagca		1800
gcaagcaca	gggtgccaag	cttcttcacc	aaagcaaggg	ctagggtcgt	tgtactacc		1860
gagtggagct	tatacacaac	agaaaccagg	gcaagggtac	aaccagggtg	gaacttctcc		1920
gtgcaccag	caagggggag	gggtcggcgg	cgggttaacg	acggagcaac	cgaggggagg		1980
aaagcagcca	ttccattgcc	agcaaacacc	tgtctcccct	caccagggtc	agcaaacacc		2040
tgtttcccct	catcagggtc	agcaaacacc	tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc		2100
tgtctcccct	caccagggtc	agcaaacacc	cgtctcccct	caccagggtc	agcaaacacc		2160
cgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc	tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc		2220
tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc	tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc		2280
tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc	tgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc		2340
cgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc	cgtctcccct	catcagggtc	agcaaacacc		2400
cgtctcccct	catcagggtc	agcagcccgg	cgagcagcct	tcgggtttcc	ctggccagca		2460
aaccaccgtg	tctctgcacc	atggtcagca	gtccaacgag	ttgtactacg	gcagcccata		2520
ccatgttagc	gtggagcagc	cgctggccag	cctaaaggta	gcaaaggcgc	agcagctcgc		2580
ggcgcagctg	ccggcaatgt	gtcggctgga	gggcggcggc	ggcctgttgg	ccagccagta		2640
gtagaactct	ggcagctcgc	atggtgcttg	ggcatgcatg	catcttagct	atacaataaa		2700
cgtgacgtgt	gcttgagtt	tttcatgtaa	ctagggtaaa	accaacaat	aatgcaaac		2760
ggaaagcttc	tccatccaaa	aaaagaacaa	aactggtgct	atatatagta	tcgctacat		2820

gtctcagctc attgtcag	2838
<210> 73	
<211> 2724	
<212> ДНК	
<213> Hordeum vulgare	
<400> 73	
gacacatatt ctgccaaaac cccagaacaa taatcacttc tcgtagatga agagaacaga	60
ccaagatata aacgtccacg cttcagcaaa cagtaccca gaactaggat taagccgatt	120
acgcggcttt agcagaccgt ccaaaaaaac tgttttgcaa agctccaatt cctccttgct	180
tatccaattt cttttgtgtt ggcaaaactgc acttctccaa ccgattttgt tcttcccatg	240
tttcttctta ggctaactaa cacagccgtg cacatagcca tgggtccggaa cttcacctc	300
gtccctataa aagcccagcc aatctccaca atctcatcat caccgagaac accgagaacc	360
acaaaactag agatcaattc attgacagtc caccgagatg gctaagcggc tggctcctct	420
tgtggcggtt atcgtcgccc tcgtggctct caccaccgct gaacctgaga tcaatgggaa	480
caacattttc cttgatagcc gctctgggca gctacagtgt gagcgcgagc tccaggagag	540
ctcgtctcag gcgtgccggc gggtcgtgga ccaacagctg gttggccagc tgccatggag	600
cacggggctc cagatgcagt gctgccagca gcttcgggac gtcagcccg agtgccggc	660
cgctgccctc agccaggtcg tgaggcaata cgagcagcaa accgaggtgc catccaaggg	720
aggatccttc tacccgggcg ggaccgcacc gccgctgcag caaggaggat ggtgggggac	780
ctctgtaaaa tgggtactacc cagaccaaac ttcttcgcaa cagtcattggc aagggcaaca	840
agggtagcac caaagcgtaa cttcttccca gcagccagga caagggcagc aagggctcta	900
cccagggtca actttccgc agcagccagg acaaggacaa caaccaggac agaggcagcc	960
atggtcctat ccaagtgc aa ctttccaca acagccagg caagggcaag ggcaagggca	1020
acaagggtac tacccaggcg caacttcctt gctgcagcca ggacaagggc aacaagggca	1080
ctaccaagt gcaacttctc cacagcagcc aggacaagga cagggacaac aagagcccta	1140
tccaattgca acttccccgc atcagccagg acaatggcaa caaccaggac aagggcaaca	1200
aggggtactac ccaagtgtaa cttctccaca acagtcggga caagggcaac aagggtagcc	1260
aagtacaact tctccacaac aatcggggca agggcaacag ctgggacaag ggcaacaacc	1320
aggacaagg caacaagggt acccaagtgc aacttttcca caacagccag gacaatggca	1380
acaagggtcc tacccaagta caacttctcc gcagcagtc ggacaagggc aacaagggtta	1440
caaccaagt ggaacttcta cgcagcagcc gggacaagtg caacagtgg gacaagggca	1500
acaagggtac tacccaattg caacttctcc gcagcagcca ggacaagggc aacagctagg	1560
acaagggcaa caaccaggac atgggcaaca gctagtgc aaaggcaaac aaggacaagg	1620
gcaacaagga cactacccaa gtatgacttc tccgcaccaa acaggacaag ggcaaaaagg	1680
atactacca agtgcaattt ctccgcagca gtcaggacaa ggacaacaag gataccagcc	1740
tagtggagct tcttcacagg ggtcgggtgc aggggcgtac cagcacagca catcttctcc	1800
gcagcagcaa gcacaagggt gccaaagctt ttcaccaaa caagggctag ggtcgttgta	1860

ctacccgagt ggagcttata cacaacagaa accagggcaa gggtagaacc caggtggaac 1920
 ttctccgctg caccagcaag ggggagggtt cggcggcggg ttaacgacgg agcaaccgca 1980
 gggaggaaag cagccattcc attgccagca aaccactgtc tccccctacc agggtcagca 2040
 aaccactgtc tccccctatc agggtcagca aaccactgtc tccccctatc agggtcagca 2100
 aaccactgtc tccccctacc agggtcagca aaccactgtc tccccctatc cgggtcagca 2160
 aaccactgtc tccccctatc agggtcagca aaccactgtc tccccctatc cgggtcagca 2220
 aaccaccgtc tccccctatc agggtcagca aaccaccgtc tccccctatc agggtcagca 2280
 aaccaccgtc tccccctacc agggtcagca gcccggcgag cagccttgcg gtttcctgg 2340
 ccagcaaacc accgtgtctc tgcacatgg tcagcagtc aacgagttgt actacggcag 2400
 cccataccat gttagcgtgg agcagccgtc ggcagccta aaggtagcaa aggcgcagca 2460
 gctcgcggca cagctgccgg caatgtgtcg gctggaggggc ggcggcgcc tgttgccag 2520
 ccagtagtag aactctggca gctcgcagtg tgcttgggca tgcatgcacc ttagctatac 2580
 aataaacgtg acgtgtgctt gcagtttttc atgtaactag ggtaaaaccc aacaataatg 2640
 caaacggaa agcttctcca tccaaaaaaa gaacaaaact ggtgctatat atagtatgcg 2700
 ctacatgtct cagctcattg tcag 2724

<210> 74
 <211> 747
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 74

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

165										170					175				
Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Trp	Ser	Tyr	Pro				
			180					185					190						
Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly				
		195					200					205							
Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln				
	210					215					220								
Gly	Pro	Tyr	Gln	Ser	Ala	Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln				
225					230					235					240				
Gly	His	Gln	Glu	Thr	Tyr	Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Pro	His	Gln	Pro	Gly				
				245					250					255					
Gln	Trp	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Val					
			260				265					270							
Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser	Thr				
		275				280						285							
Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln				
	290					295					300								
Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Gln					
305					310				315					320					
Gln	Pro	Gly	Gln	Trp	Gln	Gln	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro				
				325					330					335					
Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gly	Thr	Ser				
			340					345					350						
Thr	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Val	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly				
		355					360					365							
Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln				
	370					375					380								
Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	His	Gly	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Gly				
385					390					395					400				
Gln	Gln	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	His	Tyr	Pro	Ser	Met	Thr	Ser				
				405					410					415					
Pro	His	Gln	Thr	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Ala	Ile				
			420					425					430						
Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Gln	Pro	Ser	Gly				
		435					440					445							
Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Gly	Ala	Cys	Gln	His	Ser	Thr	Ser				
	450					455					460								
Ser	Pro	Gln	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Cys	Gln	Ala	Ser	Ser	Pro	Lys	Gln				
465					470					475					480				
Gly	Leu	Gly	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Gly	Ala	Tyr	Thr	Gln	Gln	Lys				
				485					490					495					
Pro	Gly	Gln	Gly	Tyr	Asn	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Pro	Leu	His	Gln	Gln				
			500					505					510						
Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Thr	Glu	Gln	Pro	Gln	Gly	Gly				
		515					520					525							
Lys	Gln	Pro	Phe	His	Cys	Gln	Gln	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	His	Gln	Gly				

530 535 540
 Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser
 545 550 555 560
 Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln
 565 570 575
 Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His
 580 585 590
 Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Pro Gly Gln Gln Thr Thr
 595 600 605
 Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Pro Gly
 610 615 620
 Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser
 625 630 635 640
 Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln
 645 650 655
 Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His
 660 665 670
 Gln Gly Gln Gln Pro Gly Glu Gln Pro Cys Gly Phe Pro Gly Gln Gln
 675 680 685
 Thr Thr Val Ser Leu His His Gly Gln Gln Ser Asn Glu Leu Tyr Tyr
 690 695 700
 Gly Ser Pro Tyr His Val Ser Val Glu Gln Pro Ser Ala Ser Leu Lys
 705 710 715 720
 Val Ala Lys Ala Gln Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg
 725 730 735
 Leu Glu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Ala Ser Gln
 740 745

<210> 75
 <211> 149
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<400> 75

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

Pro Gly Gly Thr Ala Pro Pro Leu Gln Gln Gly Gly Trp Trp Gly Thr
115 120 125

Ser Val Lys Trp Tyr Tyr Pro Asp Gln Thr Ser Ser Gln Gln Ser Trp
130 135 140

Gln Gly Gln Gln Gly
145

<210> 76
<211> 2244
<212> ДНК
<213> Hordeum vulgare

<400> 76
atggctaagc ggctggctct ctttgtggcg gtaatcgctg ccctcgtggc tctcaccacc 60
gctgaacgtg agatcaatgg gaacaacatt ttccttgata gccgctctag gcagctacag 120
tgtgagcgcg agctccagga gagctcgctc gaggcgtgcc ggcgggtcgt ggaccaacag 180
ctggttgccc agctgccatg gagcacgggg ctccagatgc agtgctgcca gcagcttcgg 240
gacgtcagcc ccgagtgccg ccccgctgcc ctccagccagg tcgtgaggca atacgagcag 300
caaaccgagg tgccatcaa gggaggatcc ttctaccgg gcgggaccgc accgcccgtg 360
cagcaaggag gatggtgggg aacctctgta aaatgggtact acccagacca aactttctcg 420
caacagtcac ggcaaggcca acaagggtac caccaaagcg taactttctc ccagcagcca 480
ggacaagggc agcaagggtc ctaccaggt tcaactttcc cgagcagcc aggacaagga 540
caacaaccag gacagaggca gccatgggtc tatccaagt caactttccc acaacagcca 600
gggcaagggc aagggaaca aggggtactac ccaggcgcaa ctctccctgt gcagccagga 660
caagggaac aagggcccta ccagagtga acttctccac agcagccagg acaaggacag 720
ggacaccaag agacctatca atttgcaact tccccgcatc agccaggaca atggcaacaa 780
ccaggacaag ggcaacaagg gtactacca agtgtaact ctccacaaca gtcgggacaa 840
gggcaaacag ggtaccaag tacaacttct ccacaacaat cggggcaagg gcaacagctg 900
ggacaagggc aacaaccagg acaaggga caagggtacc caagtgaac tttccacaa 960
cagccaggac aatggcaaca agggctctac ccaagtacaa ctctctcgca gcagtcagga 1020
caagggaac aagggtacaa cccaagtga acttctacgc agcagccggg acaagtgaac 1080
cagttgggac aagggaaca aggggtactac ccaattgcaa ctctctcgca gcagccagga 1140
caagggaac agctaggaca agggcaacaa ccaggacatg ggcaacagct agtgcaaggg 1200
caacaacaag gacaaggga acaaggacac tacccaagta tgacttctcc gcaccaacaa 1260
ggacaagggc aaaaaggata ctaccaagt gcaatttctc cgagcagtc aggacaagga 1320
caacaaggat accagcctag tggagcttct tcacaggggt cggtgcaagg ggcgtgccag 1380
cacagcacat ctctctcgca gcagcaagca caagggtgcc aagcttctc accaaagcaa 1440
gggctagggc cgttgtagta cccgagtga gcttatcac aacagaaacc agggcaaggg 1500
tacaaccag gtggaacttc tccgtgcac cagcaagggg gagggttcgg cggcgggtta 1560
acgacggagc aaccgcaggg aggaaagcag ccattccatt gccagcaac cactgtctcc 1620

cctcaccagg gtcagcaaac cactgtttcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc 1680
cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc cctcaccagg gtcagcaaac caccgtctcc 1740
cctcaccagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc 1800
cctcatccgg gtcagcaaac cactgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc 1860
cctcatccgg gtcagcaaac cactgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc 1920
cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc 1980
cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcagcc cggcgagcag 2040
ccttgccggt tccctggcca gcaaacacc gtgtctctgc accatggtca gcagtccaac 2100
gagttgtact acggcagccc ataccatgtt agcgtggagc agccgtcggc cagcctaaag 2160
gtagcaagg cgagcagct cgcggcgag ctgccggcaa tgtgtcggct ggagggcggc 2220
ggcggcctgt tggccagcca gtag 2244

<210> 77
<211> 450
<212> ДНК
<213> Hordeum vulgare

<400> 77
atggctaagc ggctggctct ctttgtggcg gtaatcgtcg cctcgtggc tctcaccacc 60
gctgaacctg agatcaatgg gaacaacatt ttccttgata gccgctctgg gcagctacag 120
tgtgagcgcg agctccagga gagctcgctc gaggcgtgcc ggcgggctgt ggaccaacag 180
ctggttggcc agctgccatg gagcacgggg ctccagatgc agtgctgcca gcagcttcgg 240
gacgtcagcc ccgagtggcg ccccgtcgcc ctccagcagg tcgtgaggca atacgagcag 300
caaaccgagg tgccatccaa gggaggatcc ttctaccgg gcgggaccgc accgccgctg 360
cagcaaggag gatggtgggg aacctctgta aaatggtact acccagacca aacttcttcg 420
caacagtcac ggcaagggca acaagggtag 450

<210> 78
<211> 181
<212> Білок
<213> Hordeum vulgare

<400> 78
Leu Ala Cys Glu Val Leu Lys Glu Arg Ser Val Cys Ile Leu Gln Leu 1 5 10 15
His Tyr Val Gln Pro Ser Ile Leu Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val 20 25 30
Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Arg Met Pro Gln Leu Ile Ala 35 40 45
Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln Ser Ser Cys His Val Leu Gln Gln Gln 50 55 60
Cys Cys Gln Gln Leu Pro Gln Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Glu Ala 65 70 75 80
Ile Arg Ala Ile Val Tyr Ser Ile Phe Leu Gln Glu Gln Pro Gln Gln 85 90 95

Ser Val Gln Gly Ala Ser Gln Pro Gln Gln Gln Leu Gln Glu Glu Gln
100 105 110
Val Gly Gln Cys Tyr Phe Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gln Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Gln Gln Val Pro Gln Ser Val Phe Leu Gln Pro His Gln Ile Ala
130 135 140
Gln Leu Glu Ala Thr Asn Ser Ile Ala Leu Arg Thr Leu Pro Thr Met
145 150 155 160
Cys Asn Val Asn Val Pro Leu Tyr Asp Ile Met Pro Phe Gly Val Gly
165 170 175
Thr Arg Val Gly Val
180

<210> 79
<211> 274
<212> Билнок
<213> Hordeum vulgare

<400> 79

Met Lys Thr Phe Leu Ile Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Thr Asn
1 5 10 15
Thr Ile Ala Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro
20 25 30
Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro
35 40 45
Phe Pro Gln Gln Pro Pro Phe Trp Trp Gln Gln Pro Val Gln Ser Gln
50 55 60
Gln Gln Pro Cys Gln Gln Gln Gln Thr Pro Leu Pro Gln Gly Gln Gln
65 70 75 80
Tyr Gln Pro Leu Leu Gln Gln Gln Ile Pro Phe Val His Pro Ser Val
85 90 95
Leu Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser
100 105 110
Pro Val Pro Met Pro Gln Arg Ile Ala Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln
115 120 125
Ser Ser Cys His Val Leu Gln Gln Gln Cys Cys Lys Gln Leu Pro Gln
130 135 140
Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Glu Ala Ile Arg Ala Ile Ile Tyr Ser
145 150 155 160
Ile Ile Leu Gln Glu Gln Gln Gln Val Gln Asp Phe Val Gln Pro Gln
165 170 175
Gln Gln Gln Pro Gln Gln Ser Val Gln Gly Val Ser Gln Ser Gln Gln
180 185 190
Gln Ser Gln Gln Pro Gln Leu Gly Gln Cys Ser Phe Gln Gln Pro Gln
195 200 205
Leu Gln Gln Leu Gly Gln Gln Pro Gln Gln Gln Gln Val Pro Leu Trp
210 215 220
Ala Phe Leu Gln Pro Gln Gln Met Ala Gln Leu Glu Val Met Thr Ser
225 230 235 240

Val Ala Leu Arg Thr Leu Pro Thr Met Cys Asn Val Asn Val Pro Leu
 245 250 255
 Tyr Gly Ile Thr Thr Ser Val Pro Leu Ser Val Gly Thr Gly Val Gly
 260 265 270

Pro Tyr

<210> 80
 <211> 347
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (161)..(161)
 <223> Хаа може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається у природі

<400> 80

Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
 1 5 10
 Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
 20 25 30
 Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
 35 40 45
 Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln
 50 55 60
 Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro
 85 90 95
 Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln
 100 105 110
 Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln
 115 120 125
 Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln
 130 135 140
 Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 Xaa Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro
 165 170 175
 Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu
 180 185 190
 Leu Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe
 195 200 205
 Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu
 210 215 220
 Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe
 225 230 235 240
 Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Phe Pro Gln
 245 250 255

Glu Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
 260 265 270
 Glu Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro
 275 280 285
 Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln
 290 295 300
 Gln Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln
 305 310 315 320
 Gln Pro Phe Leu Leu Gln Pro His Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ala Gln
 325 330 335
 Gln Asp Ile Trp Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gly
 340 345
 <210> 81
 <211> 305
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 81
 Met Lys Ile Leu Ile Ile Leu Thr Ile Leu Ala Met Ala Thr Thr Phe
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Glu Met Gln Val Asn Pro Ser Val Gln Val Gln Pro Thr
 20 25 30
 Gln Gln Gln Pro Tyr Pro Glu Ser Gln Gln Pro Phe Ile Ser Gln Ser
 35 40 45
 Gln Gln Gln Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln
 50 55 60
 Gln Pro Phe Pro Gln Ser Gln Gln Gln Cys Leu Gln Gln Pro Gln His
 65 70 75 80
 Gln Phe Pro Gln Pro Thr Gln Gln Phe Pro Gln Arg Pro Leu Leu Pro
 85 90 95
 Phe Thr His Pro Phe Leu Thr Phe Pro Asp Gln Leu Leu Pro Gln Pro
 100 105 110
 Pro His Gln Ser Phe Pro Gln Pro Pro Gln Ser Tyr Pro Gln Pro Pro
 115 120 125
 Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Pro Gln Gln Lys Tyr Pro Glu Gln Pro
 130 135 140
 Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr Ile Gln Leu Tyr Leu Gln
 145 150 155 160
 Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Glu Phe Leu Leu Gln Gln Cys Arg Pro
 165 170 175
 Val Ser Leu Leu Ser Tyr Ile Trp Ser Lys Ile Val Gln Gln Ser Ser
 180 185 190
 Cys Arg Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Leu Gln Leu Ala Gln Ile Pro
 195 200 205
 Glu Gln Tyr Lys Cys Thr Ala Ile Asp Ser Ile Val His Ala Ile Phe
 210 215 220
 Met Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gly Val Gln Ile Val Gln Gln Gln Pro

225 230 235 240
 Gln Pro Gln Gln Val Gly Gln Cys Val Leu Val Gln Gly Gln Gly Val
 245 250 255
 Val Gln Pro Gln Gln Leu Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg Thr Leu Val
 260 265 270
 Leu Gln Ser Val Pro Ser Met Cys Asn Phe Asn Val Pro Pro Asn Cys
 275 280 285
 Ser Thr Ile Lys Ala Pro Phe Val Gly Val Val Thr Gly Val Gly Gly
 290 295 300
 Gln
 305
 <210> 82
 <211> 255
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 82
 Met Gln Val Asn Pro Ser Val Gln Val Gln Pro Thr Gln Gln Gln Pro
 1 5 10 15
 Tyr Pro Glu Ser Gln Gln Pro Phe Ile Ser Gln Ser Gln Gln Gln Phe
 20 25 30
 Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Arg Pro Leu Leu Pro Phe Thr
 35 40 45
 His Pro Phe Leu Thr Phe Pro Asp Gln Leu Leu Pro Gln Pro Pro His
 50 55 60
 Gln Ser Phe Pro Gln Pro Pro Gln Ser Tyr Pro Gln Pro Pro Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Phe Pro Gln Pro Pro Gln Gln Lys Tyr Pro Glu Gln Pro Gln Gln
 85 90 95
 Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr Ile Gln Leu Tyr Leu Gln Gln Gln
 100 105 110
 Leu Asn Pro Tyr Lys Glu Phe Leu Leu Gln Gln Cys Arg Pro Val Ser
 115 120 125
 Leu Leu Ser Tyr Leu Trp Ser Lys Ile Val Gln Gln Ser Ser Cys Arg
 130 135 140
 Val Met Leu Gln Gln Cys Cys Leu Gln Leu Ala Gln Ile Pro Glu Gln
 145 150 155 160
 Tyr Lys Cys Thr Ala Ile Asp Ser Ile Val His Ala Ile Phe Met Gln
 165 170 175
 Gln Gly Gln Arg Gln Gly Val Gln Ile Val Gln Gln Gln Pro Gln Pro
 180 185 190
 Gln Gln Val Gly Gln Cys Val Leu Val Gln Gly Gln Gly Val Val Gln
 195 200 205
 Pro Gln Gln Leu Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg Thr Leu Val Leu Gln
 210 215 220
 Ser Val Pro Ser Met Cys Asn Phe Asn Val Pro Pro Asn Cys Ser Thr
 225 230 235 240

Ile Lys Ala Pro Phe Val Gly Val Val Thr Gly Val Gly Gly Gln
245 250 255

<210> 83
<211> 289
<212> Бѣлок
<213> Hordeum vulgare

<400> 83

Ile Thr Thr Thr Thr Met Gln Phe Asn Pro Ser Gly Leu Glu Leu Glu
1 5 10 15
Arg Pro Gln Gln Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln Gln Pro
20 25 30
Pro Phe Leu Gln Gln Glu Pro Glu Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Pro
35 40 45
Leu Pro Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Leu Pro His Gln
50 55 60
His Gln Phe Pro Gln Gln Leu Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln Gln Met
65 70 75 80
Pro Leu Gln Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln Gln Met Pro Leu Gln Pro
85 90 95
Gln Gln Gln Pro Gln Phe Pro Gln Gln Lys Pro Phe Gly Gln Tyr Gln
100 105 110
Gln Pro Leu Thr Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Pro Leu Ala Gln
115 120 125
Gln Gln Pro Ser Ile Glu Glu Gln His Gln Leu Asn Leu Cys Lys Glu
130 135 140
Phe Leu Leu Gln Gln Cys Thr Leu Asp Glu Lys Val Pro Leu Leu Gln
145 150 155 160
Ser Val Ile Ser Phe Leu Arg Pro His Ile Ser Gln Gln Asn Ser Cys
165 170 175
Gln Leu Lys Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu
180 185 190
Gln Ser Arg Cys Pro Ala Ile Gln Thr Ile Val His Ala Ile Val Met
195 200 205
Gln Gln Gln Val Gln Gln Gln Val Gly His Gly Phe Val Gln Ser Gln
210 215 220
Leu Gln Gln Leu Gly Gln Gly Met Pro Ile Gln Leu Gln Gln Gln Pro
225 230 235 240
Gly Gln Ala Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe Lys Val Val
245 250 255
Gly Ser Leu Val Ile Gln Thr Leu Pro Met Leu Cys Asn Val His Val
260 265 270
Pro Pro Tyr Cys Ser Pro Phe Gly Ser Met Ala Thr Gly Ser Gly Gly
275 280 285
Gln

<210> 84
<211> 173

<212> Білок
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 84

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

<210> 85
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 85

Ala Gln Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg
 1 5 10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб одержання харчового інгредієнта або інгредієнта напою на основі солоду або харчового продукту або напою на основі солоду, причому спосіб включає (i) переробку ячмінного зерна, що містить 50 м.ч. або менше гордеїнів, для одержання солоду, сусла, борошна або ціЛЬНОзернового борошна та/або (ii) змішування ячмінного зерна або солоду, сусла, борошна або ціЛЬНОзернового борошна, одержаних із вказаного зерна, зі щонайменше
- 10 одним іншим харчовим інгредієнтом або інгредієнтом напою, причому ячмінне зерно, солод, сусло, борошно або ціЛЬНОзернове борошно містить 50 м.ч. або менше гордеїнів, тим самим одержуючи харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду, харчовий продукт або напій на основі солоду.
- 15 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зерно відповідає одному або більше з наступного:
 - i) зерно містить 20 м.ч. або менше гордеїнів,
 - ii) зерно має співвідношення довжини до товщини менше ніж 5,
 - iii) зерно одержане з рослини, яка має щонайменше 60 % врожайності зерна відповідної рослини ячменю дикого типу,
 - iv) середня маса зерна становить щонайменше 70 % зерна з відповідної рослини
- 20 ячменю дикого типу, і
 - v) зерно одержане з нетрансгенної рослини, і
 - vi) щонайменше 50 % зерна проростає протягом 3 діб після набухання.
- 25 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що борошно або ціЛЬНОзернове борошно, одержане із зерна, містить 10 м.ч. або менше гордеїнів.
4. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що солод або сусло, одержані із зерна, містять менше 20 м.ч. гордеїнів.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що зерно або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, містять концентрацію менше 2 % від концентрації дикого типу одного або більше одного, або всіх з:

i) D-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 56,

5 ii) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 53,

iii) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 54, та

iv) C-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 55,

причому концентрація становить менше 2 % відносно концентрації в ячмінному зерні дикого типу або солоді, суслі, борошні або цільозерновому борошні, одержаних з вказаного зерна, що належить до різновидів ячменю Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander.

10 6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що зерно або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, не містять одного або більше, або всіх з:

i) D-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 56,

ii) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 53,

15 iii) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 54, та

iv) C-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 55.

7. Спосіб за п. 5 або 6, який **відрізняється** тим, що B-гордеїни представлені щонайменше B1-гордеїном та B3-гордеїном.

20 8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що зерно або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, додатково містять концентрацію менше 2 % від концентрації дикого типу наступних:

i) γ-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 57, і/або

ii) авеніноподібних A-білків, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 52,

25 причому концентрація становить менше 2 % відносно концентрації в ячмінному зерні дикого типу або солоді, суслі, борошні або цільозерновому борошні, одержаних з вказаного зерна, що належить до різновидів ячменю Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що зерно характеризується одним або більше, або всім з наступного:

30 i) зерно є гомозиготним за алелем локусу *Hor2*, в якому більшість або всі гени, які кодують B-гордеїни, видалені, або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає алель локусу *Hor2*, в якому більшість або всі гени, які кодують B-гордеїни, видалені,

35 ii) зерно є гомозиготним за нульовим алелем гена, що кодує D-гордеїн в локусі *Hor3*, або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає нульовий алель гена, який кодує D-гордеїн, при цьому нульовий алель переважно містить стоп-кодон, мутацію сайту сплайсингу, мутацію із зсувом рамки, інсерцію, делецію або кодує усичений D-гордеїн, або у нього більшість або всі гени, які кодують D-гордеїни, видалені, і

40 iii) зерно є гомозиготним за алелем у локусі *Lys3* ячменю, що призводить до відсутності у зерні C-гордеїнів, або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, містять ДНК, що включає алель у локусі *Lys3*.

45 10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що зерно, солод, сусло, борошно або цільозернове борошно містять 0,01 % або менше концентрації гордеїнів порівняно із зерном відповідної рослини ячменю дикого типу або солодом, суслом, борошном або цільозерновим борошном, одержаними таким самим способом із зерна відповідної рослини ячменю дикого типу.

50 11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що зерно або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, містять 2 % або менше одного, або більше одного, або всіх з наступних компонентів порівняно з відповідною рослиною ячменю дикого типу:

i) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 53,

ii) B-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 54,

iii) C-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 55, та

iv) D-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 56.

55 12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що B-гордеїни представлені щонайменше гордеїнами B1 та B3.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що зерно або солод, сусло, борошно або цільозернове борошно, одержані з вказаного зерна, додатково містять 10 % або менше з наступних компонентів, порівняно з відповідною рослиною ячменю дикого типу:

60 i) γ-гордеїнів, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 57, та/або

ii) авеніноподібних А-білків, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 52.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що рослина ячменю дикого типу являє собою сорт Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh або Commander.

5 15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що ціліакійна токсичність борошна, одержаного з цього зерна, становить менше ніж 5 % відносно борошна, одержаного із зерна відповідної рослини ячменю дикого типу.

16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що середня маса зернівки становить щонайменше від у 1,05 до у 1,3 рази більше, ніж маса зернівки, яка є

10 i) гомозиготною за алелем локусу *Hor2*, в якому більшість або всі гени, які кодують В-гордеїни, видалені,

ii) гомозиготною за алелем в локусі *Lys3* ячменю, що призводить до відсутності у зерні С-гордеїнів, та

iii) гомозиготною за алелем дикого типу D-гордеїну, що кодує повнорозмірний білок.

15 17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що зерно одержане з рослини, яка має врожайність зерна від у 1,2 до у 2,0 рази більше, ніж врожайність зерна з рослини, яка є

i) гомозиготною за алелем локусу *Hor2*, в якому більшість або всі гени, які кодують В-гордеїни, видалені,

20 ii) гомозиготною за алелем в локусі *Lys3* ячменю, що призводить до відсутності у зерні С-гордеїнів, та

iii) гомозиготною за алелем дикого типу D-гордеїну, що кодує повнорозмірний білок.

18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що зерно отримане від нетрансгенної рослини.

25 19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що зерно отримане від трансгенної рослини.

20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що рослина містить трансген, який кодує полінуклеотид, що пригнічує у зерні продукцію щонайменше одного гордеїну.

21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який включає одержання із зерна борошна або цільнозернового борошна або включає одержання із зерна солоду.

30 22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що напій на основі солоду являє собою пиво, а спосіб включає пророщування зерна або подрібнення одержаного таким чином зерна.

23. Спосіб за п. 22, який додатково включає фракціонування висушеного пророщеного зерна на дві і більше фракцій ендосперму, фракції ендотеліального шару, фракції лушпиння, фракції проростків та фракції солодових паростків, та з'єднання і змішування попередньо визначених кількостей двох або більше з цих фракцій.

35 24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що щонайменше 50 % зерна проростає у межах 3 діб після набухання.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-24, який **відрізняється** тим, що

40 i) харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду являє собою борошно, крохмаль, солод або сусло, або харчовий продукт являє собою хлібопродукти на заквасці або без закваски, макаронні вироби, локшину, сухі сніданки, закусочні харчові продукти, коржі, кондитерські вироби або продукти, які містять соуси на основі борошна, або

ii) напій на основі солоду являє собою пиво або віскі.

45 26. Спосіб за будь-яким з пп. 1-25, який **відрізняється** тим, що харчовий продукт або напій на основі солоду призначений для споживання людьми.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 1-26, який **відрізняється** тим, що після споживання харчового продукту або напою щонайменше один симптом захворювання на целіакію не проявляється у суб'єкта з вказаним захворюванням.

50 28. Рослина ячменю, яка продукує зерно, що містить близько 50 м.ч. або менше загальних гордеїнів, або її зерно, де

- зерно є гомозиготним за алелем локусу *Hor2*, в якому більшість або всі гени, які кодують В-гордеїни, видалені;

- зерно є гомозиготним за нульовим алелем гена, який кодує D-гордеїн в локусі *Hor3*, і

55 - в зерні відсутні С-гордеїни, які містять послідовність амінокислот, представлену як SEQ ID NO: 55.

29. Рослина ячменю або зерно за п. 28, яке **відрізняється** тим, що зерно містить одну або більше ознак, визначених в пп. 2, 5-13, 16-19 або 24.

30. Спосіб отримання зерна ячменю, причому спосіб включає:

а) вирощування рослини ячменю, яка продукує зерно, що містить 50 м.ч. або менше загальних гордеїнів, і
 б) збирання зерна.

31. Спосіб за п. 30, який включає вирощування щонайменше 10000 рослин за п. 28 або 29 у польових умовах на площі щонайменше один гектар.

32. Спосіб одержання борошна, цільнозернового борошна, крохмалю, солоду або сусла, одержуваного із зерна за п. 28 або 29, причому спосіб включає:

а) отримання зерна, яке містить 50 м.ч. або менше загальних гордеїнів, та

б) переробку зерна для одержання борошна, цільнозернового борошна, крохмалю, солоду або сусла.

33. Харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду або харчовий продукт або напій-продукт на основі солоду, одержаний з рослини ячменю або зерна за п. 28 або п. 29, переважно одержаний з використанням способу за будь-яким з пп. 1-27.

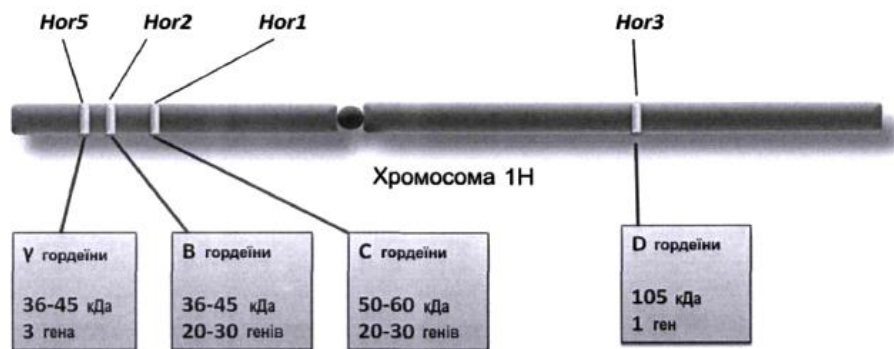
34. Харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду або харчовий продукт або напій-продукт на основі солоду за п. 33, який являє собою:

а) пиво, яке містить один або декілька білків зерна ячменю та менше 0,9 м.ч. гордеїнів,

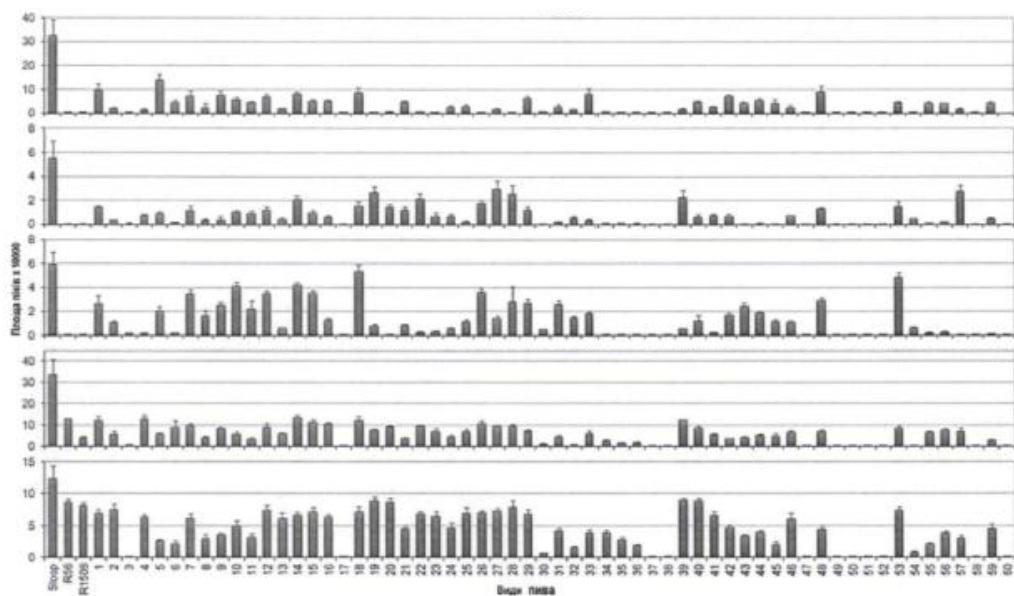
б) борошно або цільнозернове борошно, що містить один або декілька білків зерна ячменю та менше ніж 10 м.ч. гордеїнів; або

в) солод або сусло, які містять один або декілька білків зерна ячменю та менше ніж 50 м.ч. гордеїнів.

35. Харчовий інгредієнт або інгредієнт напою на основі солоду або харчовий продукт або напій-продукт на основі солоду за п. 33, який **відрізняється** тим, що напій-продукт на основі солоду являє собою пиво або віскі.



Фігура 1



Фігура 2

	10	20	30	40	50	60	70	80
Sloop con	MAKRLVLFVAVIVALVALTTAEEREINGNNIFLDSRSRQLQCERELQESSLEACRRVVDQQLVGQLPWSGTGLQMQCCQLR							
D-кул con	MAKRLVLFVAVIVALVALTTAEFEINGNNIFLDSRSRQLQCERELQESSLEACRRVVDQQLVGQLPWSGTGLQMQCCQLR							
	90	100	110	120	130	140	150	160
Sloop con	DVSPECRPVALSQVVRQTEQQTVEVPSKGGSFYPGGTAPFLQGGGMMGTSVKWTYPDQTSQQGMMQGGQGYHQSVTSSQPF							
D-кул con	DVSPECRPVALSQVVRQTEQQTVEVPSKGGSFYPGGTAPFLQGGGMMGTSVKWTYPDQTSQQGMMQGGQGYHQSVTSSQPF*							
	170	180	190	200	210	220	230	240
Sloop con	GQGGQGSYPGSTFPQQPGQGGQPGQRQPWSYPSATFPQQPGQ--GQGGQGYYPGATSLQLPGQGGQGGPYQATSPQQPGQ							
	250	260	270	280	290	300	310	320
Sloop con	GQGHQETYPATSPHQPQQMQPGQGGQGYTSPVTSPPQSGGQGTGYPSTSPQSGGQQLGQGGQPGQGGQGYPSATF							
	330	340	350	360	370	380	390	400
Sloop con	PQQPGQMMQGSYPSTSPQQSGGQGGYNPSGTSTQPGQVQQLGQGGQGYYPATSPQQPGQGGQQLGQGGQPGHQQQLV							
	410	420	430	440	450	460	470	480
Sloop con	QGGQGGGQGGHYPSTSPHQTGGQGGYTPSAISFPQSGGQGGTQPSGASSQGSGVQDAGHSTSSPQQQAQGCASSP							
	490	500	510	520	530	540	550	560
Sloop con	KQGLGLSYPSGAYTQKPGQGGYNPGGTSPLHQGGGFGGLTTEQPGGKQPFHCQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQT							
	570	580	590	600	610	620	630	640
Sloop con	VSPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTT							
	650	660	670	680	690	700	710	720
Sloop con	VSPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTTVSHPHQQQTTSVPHQGGQTT							
	730	740	750					
Sloop con	LKVAXAQQLAAQLPAMCRLEGGGGLLASQ*							

Фигура 3

	10	20	30	40	50	60	70
Sloop cop						
D-нул cop						
	80	90	100	110	120	130	140
Sloop cop						
D-нул cop						
	150	160	170	180	190	200	210
Sloop cop						
D-нул cop						
	220	230	240	250	260	270	280
Sloop cop						
D-нул cop						
	290	300	310	320	330	340	350
Sloop cop						
D-нул cop						
	360	370	380	390	400	410	420
Sloop cop						
D-нул cop						
	430	440	450	460	470	480	490
Sloop cop						
D-нул cop						
	500	510	520	530	540	550	560
Sloop cop						
D-нул cop						
	570	580	590	600	610	620	630
Sloop cop						
D-нул cop						
	640	650	660	670	680	690	700
Sloop cop						
D-нул cop						

Sloop cop: GACACATATTCTGCCAAAACCCAGAACCAATAATCACTTCTCOTAGATGAAGAGAACAGACCAAGATACA
 AACGTCCACGCTTCAGCAAACAGTACCCAGAACTAGGATTAGCCGATTACGCGCTTTAGCAGACCGT
 CCAAAAAAAGCTGTTTTCAGAAAGCTCCAATTCTCTCTGCTTATCCAATTCTTTGTGTTGGCAAACTGC
 ACTTGTCACCGATTCTGTTCTCTCCGCTGTTCTTCTTAGGCTAACTAACACAGCCGTCACATAGCCA
 TGGTCCGGAATCTTCACTCTCTCTTATAAAGCCAGCCAATCTCCACAATCTCATCATCACCAGAAC
 ACCGAGAACCAAACTAGAGATCAATTCAATTGACAGTCCACCAGATGGCTAAGCGGCTGGTCTCTT
 TGTGGCGGTAATCGTCGCCCTCGTGGCTCTCACCACCGCTGAACGTGAGATCAATGGGAACAACATTTTC
 CTGATAGCCGCTCTAGGCAGCTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAGCTCGCTCGAGGCGTGCCGGC
 L D S R S R Q L Q C E R E L Q E S S L E A C R R
 GGTCTGGACCAACAGCTGGTTGGCCAGCTGCCATGGAGCACGGGGCTCCAGATGCAATGCTGCCAGCA
 V V D Q Q L V G Q L P W S T G L Q M Q C C Q Q
 GCTTCGGGACGTCAGCCCCGAGTGCCGCCCTCGCCCTCAGCCAGTCTGTGAGGCAATACGAGCAGCAA
 L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q
 L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q

Фігура 4

```

      710      720      730      740      750      760      770
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
          ACCGAGGTGCCATCCAAGGGAGGATCCTTCTACCCGGGGGGACCGCACCCGCCCTGCAGCAAGGAGGAT
D-нул con  T E V P S K G G S F Y P G G T A P P L Q Q G G W
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      780      790      800      810      820      830      840
Sloop con  GGTGGGGAACCTCTGTAAATGGTACTACCCAGACCAAACTTCTTCGCAACAGTCATGGCAAGGGCAACA
          W G T S V K W Y Y P D Q T S S Q Q S W Q G Q Q
D-нул con  W G T S V K W Y Y P D Q T S S Q Q S W Q G Q Q
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      850      860      870      880      890      900      910
Sloop con  AGGGTACCACAAAGCGTAACCTTCTCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAAGGGTCTTACCCAGGTCA
          G Y H Q S V T S S Q Q P G Q Q Q Q G S Y P G S
D-нул con  G *
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      920      930      940      950      960      970      980
Sloop con  ACTTTCGCGCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAACAGGACAGGGCAGCCATGGTCTTATCCAAGTGCAA
          T F P Q Q P G Q G Q Q P G Q R Q P W S Y P S A T
D-нул con  3' D нул маркер
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
Sloop con  CTTTCCCAACAAGCCAGGGC-----AAGGGCAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAGGCCCAACTTCCCT
          F P Q Q P G Q G Q G Q Q G Y Y P G A T S L
D-нул con  AAGGGC
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Sloop con  GCTGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCCCTACCAAGTGCAACTTCTCCACAGCAGCCAGGACAAGGA
          L Q P G Q G Q Q G P Y Q S A T S P Q Q P G Q G
D-нул con  A
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
Sloop con  CAGGGACACCAAGAGACCTATCAATTGCAACTTCCCGCATCAGCCAGGACAATGGCAACAACAGGAC
          Q G H Q E T Y Q F A T S P H Q P G Q W Q Q P G Q
D-нул con  A . . . . C . . . . C . A .
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
Sloop con  AAGGGCAACAAGGGTACTACCAAGTGTAACTTCTCCACAACAGTGGGACAAGGGCAACAAGGGTACCC
          G Q Q G Y Y P S V T S P Q Q S G Q G Q T G Y P
D-нул con  CA
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
Sloop con  AAGTACAACCTTCTCCACAACATCGGGGCAAGGGCAACAGCTGGGACAAGGGCAACAACAGGACAAGGG
          S T T S P Q Q S G Q G Q Q L G Q G Q Q P G Q G
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
Sloop con  CAACAAGGGTACCCAAAGTGCAACTTTCCACAACAGCCAGGACAATGGCAACAAGGGTCTTACCCAAAGTA
          Q Q G Y P S A T F P Q Q P G Q W Q Q G S Y P S T
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

Фігура 4 (продовження)


```

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAACTTCTCCGAGCAGTCAGGACAAGGGCAACAAGGTACAAACCAAGTGGAACTTCTACGAGCAGCC
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGACAAGTGCACAGTTGGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAATTGCAACTTCTCCGAGCAGCCA
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGACAAGGGCAACAGCTAGGACAAGGGCAACAACAGGACATGGGCAACAGCTAGTCAAGGGCAACAAC
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGGACAAGGGCAACAAGGACACTACCCAAGTATGACTTCTCCGACCAACAGGACAAGGGCAAAAAGG
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACTACCCAAGTGCACATTTCTCCGAGCAGTCAGGACAAGGACAACAAGGATACCAAGCTAGTGGAGCT
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTTCACAGGGGTCGTTGCAAGGGGCTGCCAGCAGCAGCATCTTCTCCGAGCAGCAAGGACAAGGGT
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCAAGCTTCTTACCAAGCAAGGGCTAGGGTCTGTTGTAACCCGAGTGGAGCTTATACACAACAGAA
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCAGGGCAAGGGTACAACCCAGGTGGAACTTCTCCGCTGCACCAGCAAGGGGGAGGGTTCGGCGGGGG
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAACGACGGAACAACCGCAGGGAGGAAGCAGCCATTCCATTGCCAGCAACCACTGTCTCCCTCACC
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
Sloop con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGGOTCAGCAAAACCACTGTTCCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCACTGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCA
D-нул con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Фігура 4 (продовження)

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            AACCACTGTCTCCCTCACCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCACCAGGGTCAGCAAAACCCGCTC
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V

      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            TCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATC
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            S P H Q G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            AGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATCAGGGTCAGCA
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q G Q Q

      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            AACCACTGTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTC
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V

      2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            TCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATCAGGGTCAGCAAAACCCGCTCTCCCTCATC
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q P G E Q P C G

      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            GTTCCCTGGCCAGCAAAACCCGCTCTCTGCACCATGGTCAGCAGTCCAACGAGTTGTACTACGGCAG
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            F P G Q Q T T V S L H H G Q Q S N E L Y Y G S

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            CCCATACCATGTTAGCGTGGAGCAGCCGCTCGGCCAGCCTAAAGGTAGCAAAAGCCGAGCAGCTCGCGCG
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            P Y H V S V E Q P S A S L K V A K A Q Q L A A

      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            CAGCTGCCGGCAATGTCTCGGCTGGAGGGCGCGCGGCTCTGGCCAGCCAGTAGTAGAATCTTGGCA
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            Q L P A M C R L E G G G G L L A S Q *

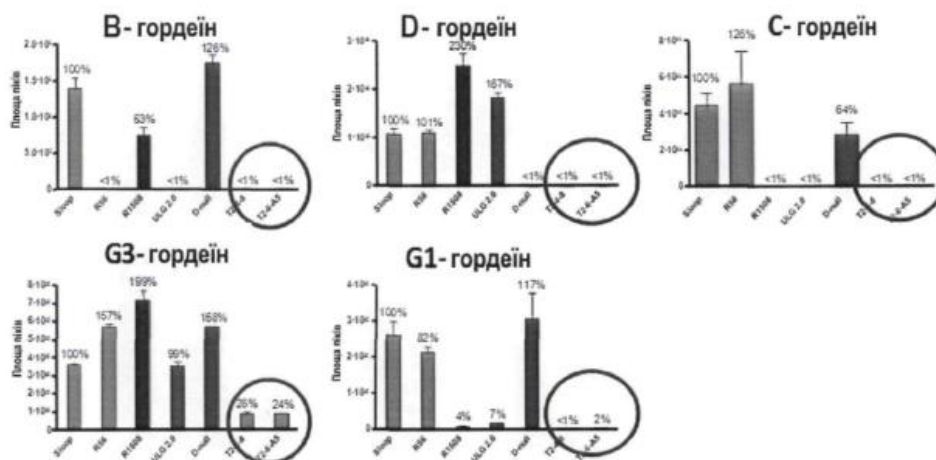
      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            GCTGCGATGGTCTGGGCGATGCATGCTTAGCTATACAATAACGTCAGCTGTGCTTCCAGTCTTTTC
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            .....C.....

      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|
            ATGTAAGTAGGTAAACCAACCAATATGCAAAACGGAAAGCTTCTCCATCCAAAAAAGAACAAAAAT
D-нул con  ....|....|....|....|....|....|....|
            .....

      2810      2820      2830      2840
Sloop con  ....|....|....|....|
            GGTGCTATATAGTATGCGCTACATGCTCAGCTCATTTGTCA
D-нул con  ....|....|....|....|
            .....

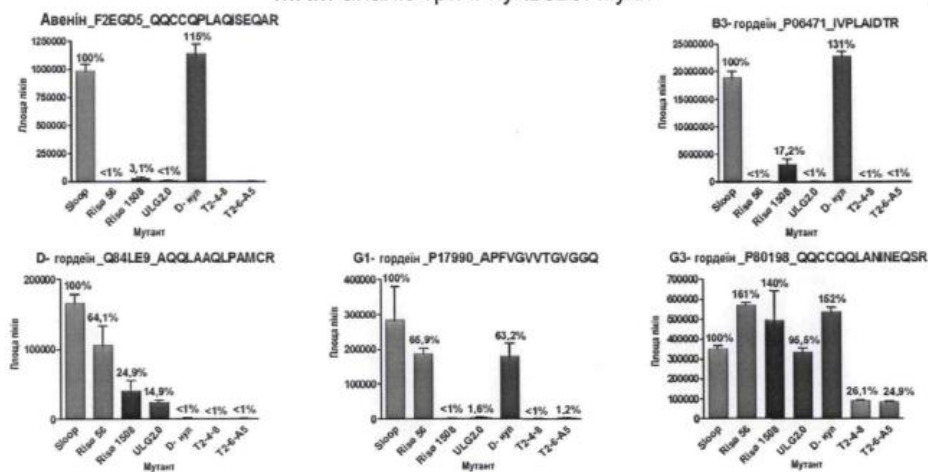
```

Фігура 4 (продовження)



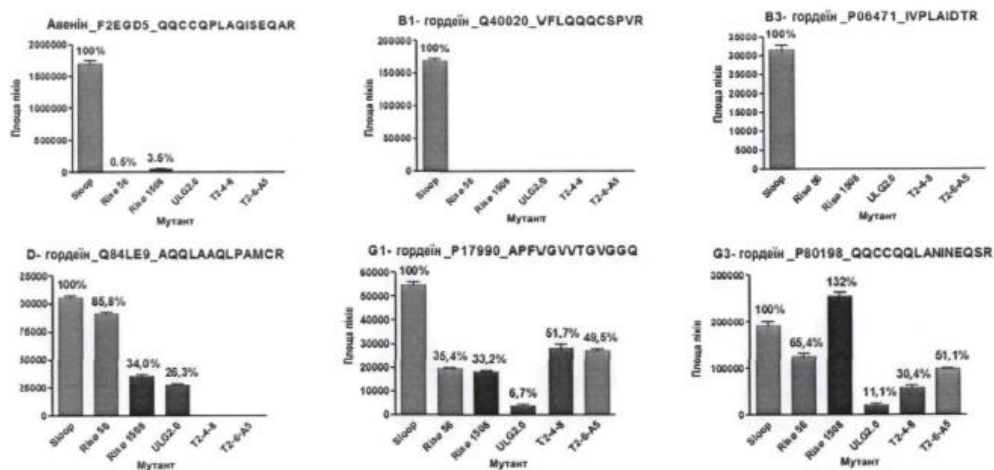
Фігура 5

MRM-аналіз тричі нульової муки

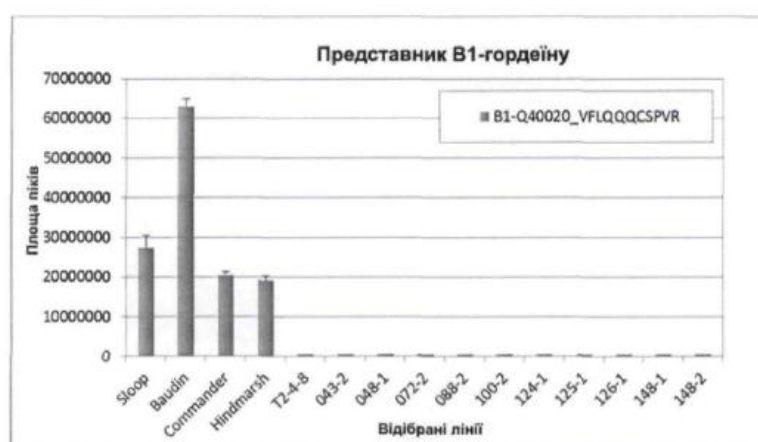
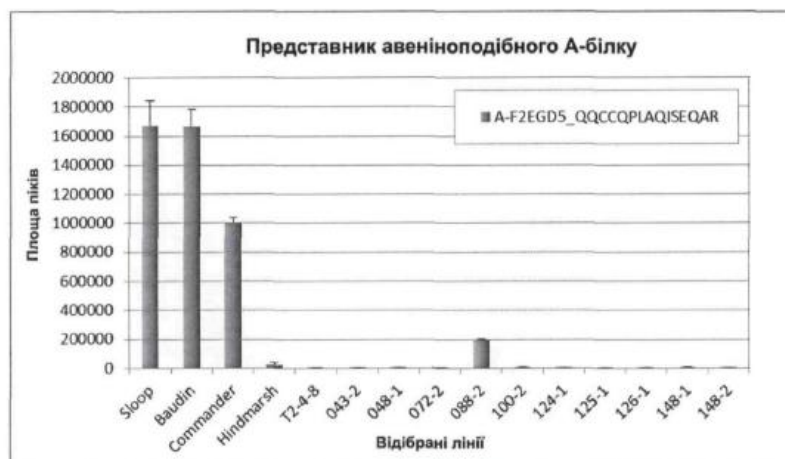


Фігура 6

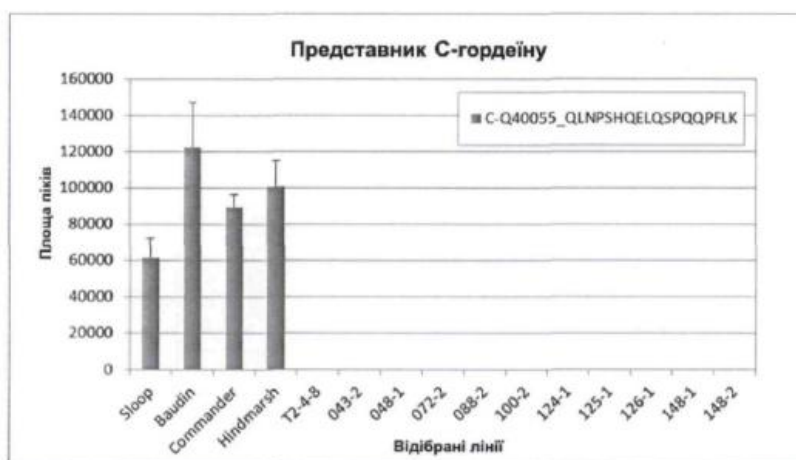
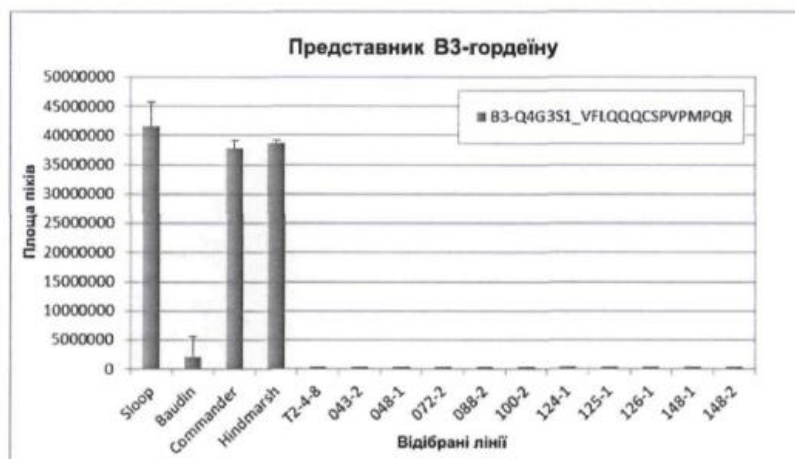
MRM-аналіз тричі нульових видів пива



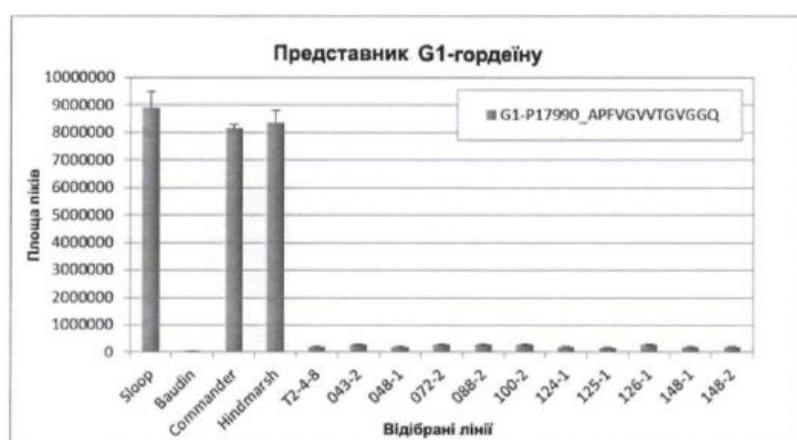
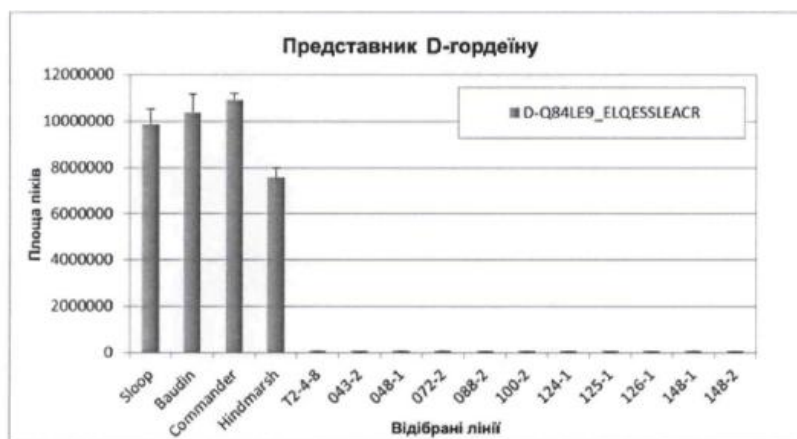
Фігура 7



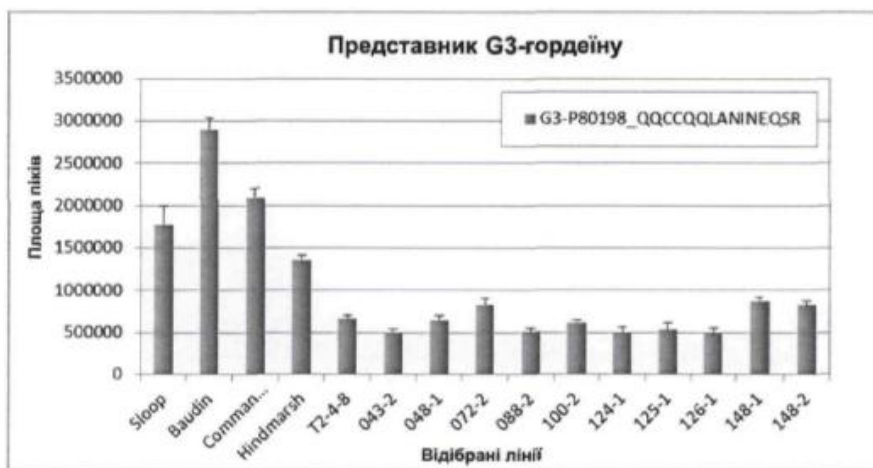
Фігура 8



Фігура 8 (продовження)



Фігура 8 (продовження)



Фігура 8 (продовження)