



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004134000/13, 23.11.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.11.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2006

(45) Опубликовано: 27.10.2006 Бюл. № 30

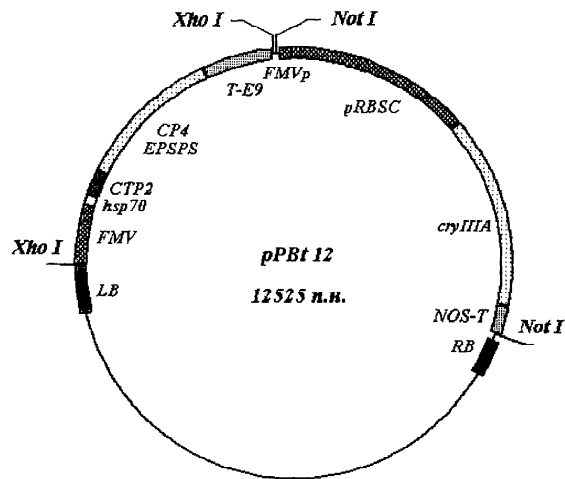
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2196824 C2, 20.01.2003. RU 2103363
C1, 27.01.1998. RU 2125091 C1, 20.01.1999.Адрес для переписки:
117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, 7,
корп.1, Центр "Биоинженерия" РАН(72) Автор(ы):
Каминская Анастасия Михайловна (RU),
Кузнецов Борис Борисович (RU),
Скрябин Константин Георгиевич (RU)(73) Патентообладатель(и):
Центр "Биоинженерия" РАН (RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩАЯ УНИКАЛЬНЫЙ ТРАНСФОРМАЦИОННЫЙ АКТ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
КОНСТРУКЦИЕЙ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ГЕН *cryIIIa*, И ГЕНОМНОЙ ДНК КАРТОФЕЛЯ СОРТА
ЕЛИЗАВЕТА, ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ И СОДЕРЖАЩИЕ ЭТУ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТКА,
ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ И ЕГО ПОТОМСТВО

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генетической инженерии, в частности к получению устойчивого к колорадскому жуку и отвечающего условиям биологической и пищевой безопасности трансгенного картофеля. Конструируют рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, имеющую общую формулу X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности, введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка

геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2. Получают клетку растения, продуцирующую белок *cryIIIa*, содержащую рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, а также трансгенное растение картофеля и его вегетативное потомство, устойчивое к колорадскому жуку. Используют полинуклеотидную последовательность для идентификации растительной клетки, продуцирующей белок *cryIIIa*, растения и вегетативного потомства. 5 н.п. ф-лы, 7 табл., 6 ил.



Обозначения на рисунке:

- LB - левая фланкирующая последовательность плазмиды Ti *A. tumifaciens* [27];
- FMV - 35S промотор вируса мозаики норичника [28];
- hsp70 - нетранслируемая лидерная последовательность белка теплового шока петунии hsp 70 [29];
- CTP2 - N-терминальный хлоропластный транзитный пептид гена EPSPS *Arabidopsis thaliana* [30];
- CP4 EPSPS - кодирующая область маркерного гена (ген *argA*) из бактерии *Agrobacterium* sp. ssp. CP4 [31];
- T-E9 - 3'-нетранслируемый район гена малой субъединицы E9 RuBisCo гороха - терминатор [32];
- FMVp - часть энхансерной последовательности промотора 35S вируса мозаики норичника [33];
- pRBSC - промотор гена малой субъединицы 1A RuBisCo из *Arabidopsis thaliana* [34];
- cryIIIA - кодирующая последовательность целевого гена *cryIIIA* [35];
- NOS-T - 3'-терминальная область гена нопалин синтетазы (NOS) *Arabidopsis thaliana* [36];
- RB - Правая фланкирующая последовательность -плазмиды Ti *A. tumifaciens* [37].

ФИГ 1



FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY, PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl. C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01) A01H 4/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

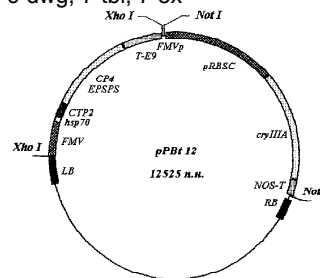
(21), (22) Application: 2004134000/13, 23.11.2004 (24) Effective date for property rights: 23.11.2004 (43) Application published: 10.05.2006 (45) Date of publication: 27.10.2006 Bull. 30 Mail address: 117312, Moskva, pr-t 60-letija Oktjabrja, 7, korp.1, Tsentr "Bioinzhennerija" RAN

(72) Inventor(s): Kamionskaja Anastasija Mikhajlovna (RU), Kuznetsov Boris Borisovich (RU), Skrjabin Konstantin Georgievich (RU) (73) Proprietor(s): Tsentr "Bioinzhennerija" RAN (RU)

(54) RECOMBINANT POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE CHARACTERIZING UNIQUE TRANSFORMATION ACT BETWEEN GENETIC CONSTRUCT INCLUDING cryIIIA GENE, AND GENOMIC DNA OF GENUS ELIZAVETA POTATO, USES THEREOF, TRANSGENIC PLANT AND GENERATION THEREOF

(57) Abstract: FIELD: gene engineering, in particular production of transgenic potato with Colorado beetle resistance and biological and food safety. SUBSTANCE: recombinant polynucleotide sequence of general formula X-A, wherein X is part of nucleotide sequence of introduced genetic construct representing in SEQ ID N 1; A is nucleotide sequence of flanking site of genomic DNA of genus Elizaveta potato, representing in SEQ ID N 2 is constructed; plant cell producing of cryIIIA protein and containing recombinant polynucleotide sequence, as well as potato transgenic plant and vegetative generation thereof with Colorado beetle resistance are obtained. Polynucleotide sequence is used in identification of plant cell producing of cryIIIA protein, plant and vegetative generation. EFFECT: new potato genus with Colorado beetle resistance.

6 cl, 6 dwg, 7 tbl, 7 ex



Обозначения на рисунке: LB - левая канюфицированная последовательность плазмиды TI A. tumefaciens [20]; FMY - 35S промотор вируса мозаики норвичика [23]; hsp70 - индуцируемая термически последовательность белка теплового шока гена hsp70 [21]; CP2 - N-терминальный хлоропластный транзитный пептид гена CP2A Arabidopsis thaliana [24]; CMV EPSPS - кодирующая область маркерного гена (ген ягода) из бактерии Agrobacterium sp. стр. CF4 [21]; T-E9 - 3' нетранслируемый район гена малой субъединицы E9 Arabidopsis thaliana - терминатор [24]; pRBSC - часть эукариотической последовательности промотора 35S вируса мозаики норвичика [23]; pRBSC - промотор гена малой субъединицы 1A RubiaSo из Arabidopsis thaliana [24]; cryIIIA - кодирующая последовательность генов cryIIIA [25]; NOS-T - 3' терминальная область гена нисаляси синтеказы (NOS) Arabidopsis thaliana [25]; RB - правая канюфицированная последовательность плазмиды TI A. tumefaciens [20];

RU 2 286 385 C2

RU 2 286 385 C2

Настоящее изобретение относится к области генетической инженерии и биотехнологии растений и связано с получением и идентификацией устойчивого к колорадскому жуку трансгенного картофеля на основе одного из новых перспективных российских сортов. Результаты реализации данного изобретения могут быть использованы в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и многих других областях народного хозяйства, использующих картофель в качестве сырья.

Вред, наносимый посевам картофеля колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata*, Say), оценивается в 18% потенциального урожая для крупных государственных производителей картофеля и от 40% до 90% для частных производителей, на долю которых согласно экспертной оценке Министерства сельского хозяйства РФ приходится 90% валового сбора картофеля в РФ. Для борьбы с этим вредителем в растениеводстве применяются различные (механические, химические и биологические) методы, однако большинство механических методов не дает желаемого результата, а использование химических агентов, как правило, оказывает неблагоприятное воздействие на окружающую среду, поскольку пестициды обычно не обладают избирательным действием и поражают в равной степени как вредную, так и полезную энтомофауну, и часто являются источником потенциальных канцерогенов и токсинов широкого спектра действия. Наиболее перспективным сегодня представляется решение этой проблемы с помощью биологических методов защиты растений, особенно методов генной инженерии, направленных на получение трансгенных растений, в клетках которых экспрессируется чужеродный белок, обеспечивающий устойчивость растения к колорадскому жуку, в частности эндотоксин *Bacillus thuringiensis*.

Уровень техники

Bacillus thuringiensis - грам-положительная спорообразующая бактерия, встречающаяся в природе в различных средах обитания: в почве, на поверхности растений, растительных остатках. *B.t.* можно отличить от других видов рода *Bacillus* по наличию формирующихся во время споруляции белковых кристаллов, благодаря которым штаммы *B.t.* являются эффективными естественными инсектицидами. Такой кристалл может состоять из одного или нескольких белков с молекулярной массой примерно 130 кДа.

Важной особенностью кристаллического *Bt*-белка является то, что его инсектицидное действие проявляется только в организме насекомых, где под действием специфических ферментов кишечного тракта он распадается с образованием протоксина, от N-конца которого затем отщепляется фрагмент длиной 65-70 кДа и образуется токсичный для насекомого полипептид (δ -эндотоксин *B.t.*). Токсин распознает специфические рецепторы на клеточной мембране эпителиальных клеток и формирует в ней поры, что приводит к осмотическому лизису и гибели клетки [1].

δ -эндотоксин *B.t.* является представителем большого семейства гомологичных белков (семейства *Cry*-белков), которых к настоящему времени идентифицировано более 130 видов [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html].

При этом каждый представитель *Cry*-белков активен только в отношении нескольких видов насекомых. Специфичность действия обусловлена тем, что каждый конкретный белок способен взаимодействовать только с рецептором определенного типа, однако есть данные, что значительную роль также играет растворимость кристалла [2]. Члены семейства *Cry*-белков группируются в подсемейства в соответствии с их специфичностью по отношению к различным семействам насекомых. Так, выделены подсемейства белков, токсичные для *Diptera* (двукрылые), *Lepidoptera* (чешуйчатокрылые), *Coleoptera* (жесткокрылые) [3]. Некоторые *B.t.*-штаммы активны против представителей других групп насекомых, а также представителей круглых червей - нематод и простейших [4].

Производные *Bt*-белка начали использовать в качестве инсектицидных препаратов в тридцатых годах прошлого века, но широкое распространение они получили только с началом производства в 1950 году препарата "Thuricide" [5]. Несмотря на репутацию экологически безопасных, биопрепараты на основе *Bt*-белка не нашли широкого применения из-за ряда недостатков, к которым можно отнести следующие:

низкая стабильность;
поверхностное действие (невозможность проникновения в растительные ткани);
узкая специфичность.

Кристаллический белок быстро разрушается под действием ультрафиолетового
5 излучения и теряет свою активность, поэтому, чтобы достичь экономически значимого
эффекта, требуется несколько обработок. Биопрепараты на основе Bt-белка являются
несистемными инсектицидами и действуют только при прямом контакте, а следовательно,
не активны против "минирующих" насекомых. Поскольку сельскохозяйственные культуры
10 обычно подвергаются нападению не одного, а нескольких видов насекомых вредителей,
для борьбы с ними применения одного вида Cry-белка может оказаться недостаточно.

Две первые проблемы могут быть решены с помощью создания трансгенных растений,
экспрессирующих определенный вид Cry-белка. В таких растениях количество токсина
постоянно возобновляется, он присутствует на постоянном уровне во всех тканях, а
следовательно, обеспечивает защиту и от "минирующих" насекомых. Проблема же узкой
15 специфичности может быть решена при одновременной экспрессии нескольких Cry-белков
с различным спектром действия.

К настоящему времени из штаммов бактерии *Bacillus thuringiensis* выделено и
охарактеризовано более 100 генов, кодирующих белки, токсичные для насекомых, в том
числе и жесткокрылых: cryIII, cryVII, cryIX [6]. Путем замены бактериальных кодонов
20 кодонами, предпочтительными для экспрессии в растениях, последовательности
бактериальных генов адаптированы к введению в растительные клетки и использованы для
трансформации различных видов культурных растений, таких как картофель [7], рапс [8],
рис [9], баклажан [10].

Результатом этих работ явилось получение множества генетически модифицированных
25 линий культурных растений, однако лишь немногие из них официально разрешены для
пищевого применения [11].

Это связано с тем, что устоявшаяся практика коммерциализации каждого нового
трансгенного растения предусматривает осуществление ряда необходимых исследований,
в ходе которых выявляется степень биологической и пищевой безопасности генетически
30 модифицированного организма. Только трансгенные линии (трансформационные события),
успешно прошедшие такой контроль, могут быть зарегистрированы как коммерческий
продукт.

Кроме того, при использовании генетически модифицированных линий различных
культурных растений существует проблема четкого пострегистрационного мониторинга,
35 предполагающего необходимость однозначной идентификации конкретного
трансформационного события как в трансгенных растениях, так и в получаемых из них
продуктах питания [12, 13, 14, 15, 16, 17].

С учетом высокого видового и сортового полиморфизма генома культурных растений и
того, что количество мест встраивания экзогенной генетической конструкции в геном
40 реципиента предположительно составляет более 10000, наиболее надежным способом
идентификации трансформационного события можно считать определение нуклеотидной
последовательности эндогенных участков, непосредственно прилегающих к введенной в
геном генетической конструкции (фланкирующих последовательностей) и последующее
детектирование этих последовательностей в геноме растения [18].

Очевидно, что успех разработок, связанных с получением трансгенных растений, во
45 многом определяется свойствами реципиента. В этом плане очень важны его способность к
регенерации и трансформации, однако при создании генетически модифицированных
линий культурных растений, обязательно должны учитываться и агротехнические
показатели исходного сорта.

50 Основные районы РФ, возделывающие картофель, характеризуются большим
разнообразием агроклиматических условий. В настоящее время в Государственном
реестре селекционных достижений РФ имеется большое разнообразие сортов картофеля,
способных давать стабильные и высокие урожаи в различных почвенно-климатических

условиях. Особенно важное практическое значение имеет правильный подбор сортов с учетом длительности периода вегетации, необходимого для их полного созревания. В основных зонах товарного картофелеводства России поздние сорта (как правило, зарубежной селекции) обычно не успевают вызреть, вследствие чего клубни сильно повреждаются при уборке и плохо хранятся [19].

В связи с этим, работы Центра "Биоинженерия" РАН, направленные на получение трансгенного картофеля, проводятся на основе лучших сортов отечественной селекции, и выполненное в рамках этого направления настоящее изобретение, которое связано с получением снабженного надежным "идентификатором" генетически модифицированного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, представляется весьма актуальным и перспективным для развития отечественного картофелеводства.

Раскрытие изобретения.

Задачей настоящего изобретения было получение трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку и отвечающего условиям биологической и пищевой безопасности, на основе перспективного отечественного сорта картофеля, а также разработка надежного средства для идентификации соответствующего трансформационного события в геноме трансгенного растения и его вегетативного потомства.

Учитывая то, что большинство коммерческих сортов картофеля, в том числе и основные российские сорта, являются трудно трансформируемыми, а также то, что даже при условии осуществления акта трансформации вероятность трансформационного события, при котором уровень экспрессии введенного гена достаточен для проявления соответствующего фенотипического признака, а экспрессия эндогенных генов растения не нарушена, весьма мала, получение положительного результата при решении поставленной задачи не являлось очевидным фактом.

Однако в результате испытаний, в которых в качестве реципиентов было использовано восемь наиболее распространенных из культивируемых в России сортов картофеля отечественной селекции, на основе сорта Елизавета заявителем были получены генетически модифицированные линии устойчивого к колорадскому жуку картофеля. Одна из этих линий (2904 кгс) в настоящее время проходит регистрацию в Государственной комиссии РФ по испытанию и охране селекционных достижений как сорт Елизавета плюс, селекционный номер 2904 кгс.

В качестве трансформирующего агента при получении трансгенного картофеля по изобретению использовали бинарный вектор pPBt12, включающий ген *csyIIIa*. Структура вектора представлена на Фиг. 1.

Поскольку процесс трансформации является генотипзависимым, трансформацию сорта картофеля Елизавета осуществляли в соответствии с заранее оптимизированным в отношении данного конкретного сорта протоколом [20]. При этом эффективность регенерации (процентное отношение количества полученных регенерантов к общему количеству использованных в эксперименте эксплантов) составила 78,4%, а эффективность трансформации (процентное отношение первичных трансформантов к общему числу регенерантов) по результатам проверки ДНК регенерантов в реакции ПЦР на содержание гена *csyIIIa* (трансгена) составила 9,3%.

При решении задачи создания надежного "идентификатора", полученного в рамках данного изобретения трансгенного картофеля, заявители руководствовались представлением об уникальности трансформационного события (строго определенной комбинации экзогенной и геномной ДНК), определившего новый фенотип растения. Для выявления полинуклеотидной последовательности, которая могла бы выполнять роль "идентификатора" уникального трансформационного события, результатом которого стало получение генетически модифицированной линии картофеля 2904 кгс, был создан протокол проведения инверсной ПЦР с использованием специфических праймеров, определенных на основании анализа нуклеотидной последовательности переносимой генетической конструкции и позволяющих амплифицировать фрагменты ДНК трансгенного растения, относящиеся к области её встраивания в геномную ДНК. После получения и

выделения амплифицированных фрагментов были определены их нуклеотидные последовательности. Оптимальным для выполнения роли "идентификатора" трансгенного картофеля по изобретению (линии 2904 кгс), был признан фрагмент, который представляет собой комбинацию экзогенной последовательности, включающей сегмент перенесенной синтетической конструкции, и прилежащей к ней (фланкирующей) последовательности геномной ДНК картофеля сорта Елизавета (фиг.3).

Полинуклеотидная последовательность отобранного нами "идентифицирующего фрагмента" может быть описана общей формулой X - A, где

- X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции с SEQ ID №1, а

- A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета с SEQ ID №2.

На основании установленных нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов геномной ДНК трансгенного картофеля предложен усовершенствованный протокол проведения идентификационной реакции, в которой получение ПЦР-фрагмента длиной 277 нуклеотидов с последовательностью, соответствующей последовательности SEQ ID №1 + SEQ ID №2, возможно только в том случае, если тестируемая геномная ДНК относится к трансформационному событию по изобретению.

Таким образом, предлагаемое изобретение представляет собой группу технических решений, объединяемых общей изобретательской концепцией.

Первый объект изобретения - рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, характеризующая уникальный трансформационный акт между генетической конструкцией, включающей ген *cryIIIa*, и геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, обеспечивающий экспрессию названного гена на уровне, достаточном для проявления у растения признака устойчивости к колорадскому жуку, с общей формулой X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2.

Второй объект изобретения - клетка растения картофеля, продуцирующая белок *CryIIIa*, которая содержит рекомбинантную полинуклеотидную последовательность с общей формулой X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2.

Третий объект изобретения - растение устойчивого к колорадскому жуку трансгенного картофеля, содержащее клетки, которые включают рекомбинантную полинуклеотидную последовательность с общей формулой X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2.

Четвертый объект изобретения - совокупность потомков растения устойчивого к колорадскому жуку трансгенного картофеля, сохранивших в ряду поколений генотипический признак родительского организма, контролируемый по наличию в геноме рекомбинантной полинуклеотидной последовательности с общей формулой X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2.

Пятый объект изобретения - применение рекомбинантной полинуклеотидной последовательности с общей формулой X-A, где X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2, для идентификации генетически модифицированных клеток растения и совокупности его вегетативных потомков по

изобретению.

Техническим результатом настоящего изобретения является получение производной от отечественного сорта Елизавета промышленно применимой линии 2904 кгс трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, обеспеченной надежным средством её генетической идентификации.

Краткое описание чертежей (перечень графических материалов).

Фиг. 1 - схема основных генетических элементов трансформационного вектора pPBt12.

Фиг. 2 - схема трансформации картофеля.

Фиг. 3 - схема получения уникального ПЦР - идентификатора трансгенной линии.

Фиг. 4 - результат проведения ПЦР с праймерной системой pR1-pR2 на ДНК трансформированных линий картофеля.

Фиг. 5 - результат проведения инверсной ПЦР на ДНК трансгенной линии 2904 кгс.

Фиг. 6 - результат проведения идентификационной ПЦР на различных линиях картофеля.

Осуществление изобретения.

Пример 1. Трансформация растений картофеля сорта Елизавета.

Культура исходных растений.

Исходные растения сорта Елизавета, свободные от вирусной и виroidной инфекции в количестве 100 шт. культивировали в асептических условиях в культуре *in vitro*. Для этого стебли исходных растений нарезали на черенки с одной пазушной почкой и культивировали в вегетационных сосудах на питательной среде, содержащей минеральные соли и витамины (среда MSbase, табл.1), при температуре +18 - 21°C \pm 1°C в дневное и +15 - 18°C \pm 1°C в ночное время и фотопериодичности 16 часов день/8 часов ночь (освещенность 120 μ Е) 3 - 5 недель.

Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV, содержащий плазмиду pPBt12, в состав кассеты экспрессии которой входят промотор FMV, энхансер HSP70+ СТР, синтетический аналог гена CP4, - терминатор E9, промотор SSU1A, ген *cryIIa* и - терминатор NOS, объединенные в генетической конструкции как показано на Фиг. 1.

Подготовка штамма.

Подготовку штамма *A. tumefaciens* GV проводили следующим образом. Засевали штамм *A. tumefaciens* GV, штрихом на питательную среду LB (табл.4), содержащую селективные антибиотики стрептомицин, спектиномицин и канамицин в концентрации 50 мг/л каждого, хлорамфеникол в концентрации 25 мг/л, на 3 \pm 0,5 суток в темноте при +26 \pm 1°C.

За два дня до планируемой трансформации засевали смесью колоний первую (I) ночную культуру штамма *A. tumefaciens* GV объемом 6 мл \pm 0,2 в питательной среде LB (табл.4), содержащей селективные антибиотики стрептомицин, спектиномицин и канамицин в концентрации 50 мг/л каждого, хлорамфеникол в концентрации 25 мг/л при +26°C \pm 1°C, 100-140 \pm 10 об/мин.

За день до сокультивации засевали вторую (II) ночную культуру объемом 6 \pm 1 мл. Для этого вносили в питательную среду LB (табл.4), содержащую селективные антибиотики стрептомицин, спектиномицин и канамицин в концентрации 50 мг/л каждого, хлорамфеникол в концентрации 25 мг/л, ночную культуру I в количестве 1/100 от конечного объема. Культивировали при +26°C \pm 1°C и 100-140 \pm 10 об/мин.

Проводили прекультивацию, для чего нарезали стебель на сегменты без пазушных почек длиной 5 -10 \pm 2 мм. Заливали чашки Петри небольшим количеством (4-5 \pm 1 мл) питательной среды (среда CIM, табл. 1) и накрывали их сверху двумя бумажными стерильными фильтрами. Экспланты, полученные из 100 исходных растений, в количестве 602 штук раскладывали поверх фильтров для прекультивации на 24 \pm 4 часа при 18-21 \pm 1°C.

Первый день трансформации

Ночную культуру штамма *A. tumefaciens* разводили в 5-7 раз жидкой средой CIM. 2. Для проведения этапа сокультивации наносили разведенную суспензию штамма (0,2-0,5 \pm 0,05

мл) равномерно по поверхности агаризованной питательной среды, для чего фильтры с эксплантами аккуратно снимали, а затем возвращали поверх нанесенной суспензии, экспланты раскладывали на влажном фильтре для сокультивации на 48 ± 4 часов при $16-20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

5 В контрольном варианте вместо суспензии штамма *A. tumefaciens* GV использовали такое же количество жидкой питательной среды (среда CM, табл.1).

После проведения этапа сокультивации отмывали экспланты согласно следующей схеме.

10 Помещали экспланты в раствор (25 ± 10 мл), содержащий жидкую среду (среда CM, табл.1) и раствор антибиотика карбенициллина (500 мг/л), подавляющего развитие штамма *A. tumefaciens* GV, отмывали с использованием ротационной качалки (шейкера) при $50-70 \pm 10$ об/мин в течение 30 ± 10 минут при комнатной температуре ($18-20^\circ\text{C}$).

Третий день трансформации

15 После сокультивации (включая этап отмывки) помещали экспланты на питательную среду (среда CIM, табл.1) для инициации каллусообразования.

Использовали в питательной среде для инициации каллусообразования зеатин в концентрации $1,0 \pm 0,01$ мг/л, БАП в концентрации $1,0 \pm 0,01$ мг/л и НУК в концентрации $0,02 \pm 0,005$ мг/л.

20 Восьмой день трансформации

Переносили экспланты на чашки со средой RM для регенерации (среда RM, табл.1) с добавлением селективного агента глифосата (N-фосфонометилглицин) в концентрации 4,23 мг/л. В качестве селективного агента использовали глифосат, так как генетическая конструкция содержит синтетический аналог гена CP4 EPSPS, кодирующий фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, экспрессия которого обеспечивает устойчивость к глифосату.

Для тестирования эффективности процесса регенерации в контрольных вариантах использовали среду для регенерации без добавления селективного агента (среда RM, табл.1).

30 Использовали в питательной среде для регенерации зеатин в концентрации $1,0 \pm 0,01$ мг/л, БАП в концентрации $1,0 \pm 0,01$ мг/л и ГК₃ в концентрации $0,02 \pm 0,01$ мг/л.

Через каждые 14 дней

Переносили экспланты на свежие чашки Петри со средой для регенерации того же состава.

35 При появлении регенерантов

Срезали регенеранты и переносили их в пробирки, содержащие среду для укоренения (среда RIM, табл.1).

Первичные регенеранты в количестве 472 штуки, укоренившиеся на селективной среде содержащей глифосат в концентрации 4,23 мг/л, считали прошедшими первичный отбор.

40 Таким образом, эффективность регенерации составила 78,4%.

45 Для приготовления сред, представленных в табл.1, готовили раствор MS-солей в деионизованной воде, доводя pH до значения $5,6-5,8 \pm 0,1$ с помощью растворов 1N KOH и 1N HCl. Стерилизацию сред осуществляли в автоклаве при 1 атм, 121°C в течение 20 минут. После охлаждения среды до $+45 \div 50^\circ\text{C}$ добавляли витамины (табл.3), гормоны, антибиотики и селективные агенты (методика приготовления и концентрации исходных растворов см. табл.2) соответственно составу сред и заливали чашки Петри (9 см) по 20 ± 5 мл среды в каждую.

Таблица 1. Состав питательных сред для поддержания культуры *in vitro* и трансформационного процесса

50	Компоненты	Среда MSbase	Среда CM	Среда CIM	Среда RM	Среда RIM
	MS-соли**	+	+	+	+	+
	Сахароза	10 мг/л	30 мг/л	30 мг/л	30 мг/л	30 мг/л
	Агар	8-9 мг/л	8-9 мг/л	8-9 мг/л	8-9 мг/л	8-9 мг/л
	Витамины	+	+	+	+	+

НУК/ИУК	-	0,01±0,04 мг/л	0,01±0,04 мг/л	-	-
Зеатин		0,5±1,5 мг/л	0,5±1,5 мг/л	0,5±1,5 мг/л	
БАП		0,5±1,5 мг/л	0,5±1,5 мг/л	0,5±1,5 мг/л	
ГКЗ	-	-	-	0,01±0,04 мг/л	-
AgNO ₃ нитрат серебра	-	-	10 мг/л	10 мг/л	-
Селективный агент глифосат	-	-	4,23 мг/л	4,23 мг/л	4,23 мг/л
Антибиотик, подавляющий агробактерию (Cb и/или Cf)	-	-	500 мг/л	500 мг/л	500 мг/л

** [21]

Таблица 2. Приготовление и условия хранения компонентов питательных сред

Исходные растворы (стоки) 100 мл	Методика приготовления	Хранение
Канамицин (Km), 100 мг/мл	Растворить в MQ H ₂ O*	- 20°C***
Хлорамфеникол (Ch), 25 мг/мл	Растворить в этаноле	- 20°C
Спектиномицин (Sp), 50 мг/мл	Растворить в MQ H ₂ O	- 20°C
Стрептомицин (St), 50 мг/мл	Растворить в MQ H ₂ O	- 20°C
Карбенициллин (Cb), 100 мг/мл	Растворить в MQ H ₂ O	- 20°C
Цефотаксим (Cf), 100 мг/мл	Растворить в MQ H ₂ O	- 20°C
НУК (NAA), 0,02 мг/мл	20 мг порошка + 1 мл 1N NaOH до 100 мл H ₂ O**	0 °C
БАП (BAP), 1 мг/мл	100 мг + 1 мл 1N NaOH до 100 мл H ₂ O**	0 °C
ГКЗ (GA3), 0,02 мг/мл	20 мг порошка + 100 мл 50% этанола**	0°C
Зеатин рибозид (Zeatin), 1 мг/мл	100 мг порошка + 1 мл 1N NaOH до 100 мл H ₂ O**	0°C
Глифосат (Gly), 8,455 мг/мл	84,55 мг порошка + 1 мл 1N KOH +до 100 мл MQ H ₂ O	- 20°C

* - деионизированная вода с помощью установки Milli Q;** - стерилизовать фильтрованием с помощью мембранных фильтров (Millipore, диаметр пор 0,22 мкм);

*** - стоки антибиотиков хранятся 1 месяц при 4°C; при -20°C большинство антибиотиков сохраняют стабильность в течение нескольких месяцев.

Таблица 3. Состав комплекса витаминов

Ингредиент	Концентрация мг/л
Никотиновая кислота	1,0
Пиридоксин * HCl (витамин B6)	1,0
Тиамин (витамин B1)	1,0
пантотенат кальция	1,0
Инозитол	50,0
Биотин	1,0
Глицин	2,0
Фолиевая кислота	0,5

Таблица 4. Состав питательной среды Luria-Bertani

Компоненты	Концентрация, г/л
Хлорид натрия NaCl	10,0
Триптон	10,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Бакто агар	15,0

Пример 2. Подтверждение трансгенной природы полученных регенерантов с помощью ПЦР-анализа.

ПЦР-анализ трансгенных линий

Прошедшие отбор первичные регенеранты в количестве 472 штук проверяли на наличие перенесенной генетической конструкции при помощи ПЦР-анализа с праймерами, специфичными для кодирующей области трансгенной конструкции. Для ПЦР-анализа генома растений на наличие гена *csylla* использовали праймерную систему pr1 (SEQ ID№3) - pr2 (SEQ ID№4).

При условии включения гена *csylla* в геномную ДНК картофеля применение указанной праймерной пары при проведении ПЦР должно было приводить к образованию фрагмента ДНК длиной 673 пары нуклеотидов. В случае необходимости провести более детальный анализ получаемых продуктов ПЦР дополнительно мог быть использован рестрикционный

анализ. При расщеплении рестриктазой Pvu II ПЦР-продукт, соответствующий трансгенной вставке, должен распадаться на два фрагмента размером 278 и 395 пар нуклеотидов.

Протокол выделения ДНК.

Для выделения ДНК 25-50 мг растительной ткани (листовая пластинка) растирали в гомогенизаторе в 120 мкл буфера I (50 mM Tris HCl, pH8.0; 10 mM EDTA; 50 мкг/мл панкреатической РНКазы) до получения гомогенной суспензии. Затем к полученной суспензии добавляли 125 мкл лизирующего буфера II (0.2 M NaOH; 1% додецил сульфата Na). Полученную смесь обрабатывали на качающейся платформе 2 минуты при комнатной температуре +18-21°C ±1°C. Далее переносили пробирки в термостат и инкубировали при 65°C в течение 45 минут. По окончании инкубации пробирки охлаждали до температуры 20-25°C и добавляли в каждую по 125 мкл нейтрализующего раствора III (2.5 mM ацетата K, pH 4.5). Содержимое пробирок тщательно перемешивали на качающейся платформе и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в новые микроцентрифужные пробирки, содержащие 500 мкл смолы Wizard MaxiPreps, и, далее, выделяли ДНК согласно рекомендациям фирмы Promega для набора Wizard Prep. Концентрация ДНК в получаемых препаратах составляла 15-100 мкг/мл. Полученные препараты ДНК были хорошего качества ($\lambda_{260} : \lambda_{280} > 1.8$), были пригодны для амплификации и согласно данным электрофоретического анализа содержали РНК в следовых количествах (менее 1%).

Протокол проведения ПЦР.

Были выбраны следующие условия проведения ПЦР:

первый цикл: 94°C - 1 мин, 55°C - 1 мин, 72°C - 1 мин,

последующие 35 циклов: 94°C - 15 сек, 55°C - 15 сек, 72°C - 20 сек, окончательная

полимеризация: - 7 минут.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Документирование результатов осуществлялось на установке гель - документации BioDoc II (Biometra, Германия). Появление ПЦР-продукта длиной 673 нуклеотидов (при условии отсутствия его в реакциях, поставленных на контрольной ДНК) свидетельствовало о присутствии искомого гена в геномной ДНК анализируемого растения.

Наличие трансгена было подтверждено для 44 из 472 проанализированных регенерантов (фиг. 4). Таким образом, эффективность трансформации составила 9,3 %.

Пример 3. Определение уровня экспрессии целевого гена (cryIIa) в трансгенных растениях.

Для количественного определения уровня экспрессии целевого гена в растениях трансгенной линии использовали метод иммуоферментного анализа.

Получение разведений белка CryIIa для стандартной кривой титрования.

Перед титрованием стандартного белка CryIIa исходный раствор с концентрацией 500 мкг/мл разводили в 500 раз (получали раствор А - 1 мкг/мл). Ряд дальнейших разведений для получения стандартной кривой ИФА готовили в соответствии с приводимой ниже таблицей (табл. 5).

Таблица 5. Схема разведений стандартного белка

№№ разведений	1	2	3	4	5	6	7
Концентрация cryIIa, рг/мл	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Разведение	1	2	4	8	16	32	64
№ добавляемого р-ра	Буфер	1	2	3	4	5	6
Объем добавл. р-ра, мкл	20	400	400	390	350	300	200
Объем ELISA буфера, мкл	1230	400	400	390	350	300	200
Суммарный объем смеси, мкл	1250	800	800	780	700	600	400
Объем остающегося р-ра, мкл	850	400	410	405	400	400	400

Получение разведений гомогената растительной ткани для проведения анализа.

Для получения гомогената 25-50 мг растительной ткани (листовая пластинка) растирали в микропробирке на микрогомогенизаторе растительных тканей IKA RW16 basic в 1x

буфере PBS (80 г NaCl, 21.68 г Na₂HPO₄(x7H₂O), 2 г KH₂PO₄, 2г KCL, pH 7.3-7.5; 20 г БСА на 1 литр 10-кратного раствора) до получения гомогенной суспензии в соотношении 1 мг ткани на 24 мкл буфера (первичное разведение 1:25). Растирание проводили до получения однородной суспензии, без видимых невооруженных глазом неоднородностей.

5 Ряд дальнейших разведений исследуемого препарата для проведения ИФА готовили в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Схема разведений исследуемого препарата

№№	1	2	3	4	5	6	7
Концентрация ткани, мг/мл	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025
Разведение	1	2	4	8	16	32	64
№ добавляемого р-ра	В	1	2	3	4	5	6
Объем добавл. р-ра, мкл	32	400	400	390	350	300	200
Объем ELISA буфера, мкл	768	400	400	390	350	300	200
Суммарный объем смеси, мкл	800	800	800	780	700	600	400
Объем остающегося р-ра, мкл	400	400	410	405	400	400	400

10

15

Подготовка иммунологических плашек для проведения анализа.

Исходный раствор (1 мг/мл) поликлональных антител против целевого белка перед покрытием ячеек разводили в 1000 раз. В каждую ячейку плашки наносили по 200 мкл разведенных антител и инкубировали плашку при комнатной температуре в течение 4 ч.

20

Блокировка ячеек плашки.

Для предотвращения неспецифической сорбции белка после окончания инкубации с поликлональными антителами плашку промывали трижды буфером 1х PBS и наносили в каждую ячейку по 200 мкл 0,2% раствора БСА в 1х PBS с 0,05%. Инкубировали плашку при комнатной температуре в течение 4 часов и трижды промывали буфером 1х PBS. Далее

25

приготовленную плашку хранили при +4°C до момента использования не более 3 суток.

Д. Загрузка плашек исследуемым препаратом.

В соответствующие ячейки плашки вносили по 200 мкл разведений 2 - 7 стандарта и разведений 2 - 7 исследуемого гомогената. Нанесения и для стандарта, и для исследуемого образца проводили дважды в независимые ячейки плашки. Инкубировали плашку при комнатной температуре в течение 4 часов или при +4°C в течение ночи. По

30

окончании инкубации трижды промывали ячейки плашки буфером 1х PBS.

Выявление результатов ИФА.

В каждую ячейку плашки вносили по 200 мкл разведенного в 1000 раз раствора конъюгата антител и инкубировали плашку при комнатной температуре +18 - 21°C ±1°C в течение 4 часов или при +4°C в течение ночи. По окончании инкубации трижды промывали

35

ячейки плашки буфером 1х PBS. Далее добавляли в каждую ячейку по 200 мкл раствора хромогена и инкубировали плашку при комнатной температуре, периодически проверяя оптическую плотность раствора в ячейках на плащечном спектрофотометре при длине волны 405 нм. По достижении оптической плотности 1,0-1,2 инкубирование прекращали и

40

проводили окончательное измерение оптической плотности раствора в ячейках.

Ж. Интерпретация результатов ИФА.

Для выявления трансгенных линий картофеля с уровнем экспрессии целевого гена более 10 мкг/г ткани проводили сравнение оптической плотности раствора в ячейках, содержащих одинаковые разведения стандарта и исследуемого раствора. Случаи, когда

45

оптическая плотность раствора в обоих разведениях 5 и 6 исследуемого образца превышала значения оптической плотности соответствующих разведений стандарта, были интерпретированы как уровень экспрессии целевого белка более 10 мкг/г ткани.

Было выявлено 56 трансгенных линий с уровнем экспрессии белка CryIIIa меньшим или равным 10 мкг/г ткани и 43 трансгенные линии с уровнем экспрессии белка CryIIIa более

50

10 мкг/г ткани, которые были переданы для дальнейших исследований.

Пример 4. Получение трансгенной линии.

Полевые испытания.

В 2000 году были проведены ограниченные полевые испытания (зарегистрированный

участок №09-П/1999) с целью размножения и наработки клубневого материала полученных трансгенных растений картофеля сорта Елизавета.

В период 2001 по 2003 года на зарегистрированных МВК ГИД участках №09-П/1999 (ВНИИ Фитопатологии РАСХН, пос. Б. Вяземы, Московская обл.) и №07-П/2002 (Агрофирма "Рогачево", Дмитровский р-н, Московская обл.) были проведены ограниченные полевые испытания полученных трансгенных линий картофеля сорта Елизавета. Испытания проводили с целью подтвердить проявление внесенного признака в полевых условиях и отобрать линии, соответствующие исходному сорту по оценке отличимости, однородности и стабильности по международной системе UPOV [22].

По результатам проведенных полевых испытаний 2001-2003 гг. были отобраны 3 линии картофеля сорта Елизавета, проявляющие выраженную устойчивость к колорадскому жуку и при этом сохраняющие свойства исходного сорта. Отобранные линии были переданы на анализ копийности вставки гена *csyIIIa*.

Пример 5.

Анализ на копийность вставки гена *csyIIIa* методом гибридизации по Саузерну.

Получение меченых зондов.

Меченые зонды для проведения гибридизации по Саузерну готовили на основе ПЦР-фрагментов, полученных на векторной ДНК, использованной при трансформации картофеля. При этом зона перекрытия каждого из зондов с маркерным рестрикционным *HindIII*-фрагментом (длина 1800 пар нуклеотидов) составляла не менее 300 пар нуклеотидов.

ПЦР на векторной ДНК проводили следующим образом:

94°Сх1 мин, 56°Сх30 сек, 72°Сх2 мин, 25 циклов.

Метку в состав зонда вводили при помощи циклической линейной полимеразной реакции с применением одного из праймеров каждого ПЦР-фрагмента. Таким образом, полученные зонды являлись одонитевыми, что предотвращает самогибридизацию зонда и повышает чувствительность гибридизации примерно в 5-7 раз.

Условия проведения линейной реакции на ПЦР-фрагментах были следующими:

94°Сх1 мин, 56°Сх30 сек, 72°Сх4 мин, 20 циклов. В указанных условиях происходило

включение в состав одонитевых зондов 45-70% метки.

Протокол проведения гибридизации по Саузерну.

Для проведения анализа полученные препараты ДНК, обработанные рестриктазами *HindIII* и *EcoRV*, разделяли с помощью электрофореза в 0.7% агарозном геле. В качестве контроля использовали стандартные количества ДНК (1 нг, 0.1 нг и 0.01 нг), содержащей исследуемую вставку плазмиды *rMON38943*, обработанной теми же рестриктазами. По окончании электрофореза ДНК переносили на мембрану Hybond XL (Amersham) с использованием метода капиллярного переноса [23]. ДНК фиксировали на мембране с помощью облучения ультрафиолетом в течение 5 секунд (4 лампы мощностью 8 кВт). Гибридизацию с меченым зондом и последующую отмывку от не гибридизованного зонда проводили в соответствии с рекомендациями производителя мембраны (Hybond XL, Amersham). Полученные мембраны экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 170 часов. Радиоавтографии сканировали и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop. Было показано, что в геноме всех трех проанализированных линий присутствует единичная вставка гена *csyIIIa*.

Для дальнейших исследований была отобрана линия 2904 кгс.

Пример 6. Определение полинуклеотидной последовательности, характеризующей трансформационное событие.

Для выявления в геномной ДНК картофеля генетически модифицированной линии 2904 кгс фрагмента, включающего область совмещения экзогенной и эндогенной

(фланкирующей искусственную вставку) ДНК, который мог бы быть использован в качестве идентификатора данного трансформационного акта, был применен метод инверсной полимеразно-цепной реакции [24], осуществлявшийся в соответствии со схемой, приведенной на фиг. 3.

Для этого 500 нг геномной ДНК картофеля разрезали при помощи рестрикционной эндонуклеазы RsaI в соответствии с протоколом, рекомендованным фирмой-изготовителем ("Сибэнзим", Новосибирск, Россия). По окончании переваривания фрагментированную ДНК пересаждали 2,5 объемами этанола и растворяли в 50 мкл лигазного буфера,

5 рекомендованного фирмой-изготовителем ("Сибэнзим", Новосибирск, Россия). Далее была проведена ступенчатая ПЦР с применением праймеров F1(SEQ ID №5)-R1(SEQ ID №6) на первой стадии и праймеров F2(SEQ ID №7)-R2(SEQ ID №8) на второй стадии.

Первую стадию ПЦР проводили по протоколу: 94°C - 3 мин, затем 35 циклов 94°C - 30 сек, 60°C - 40 сек, 72°C - 5 мин, окончательная полимеризация при 72°C - 7 мин. Вторую
10 стадию ПЦР проводили по протоколу: 35 циклов 94°C - 20 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 4 мин, окончательная полимеризация при 72°C - 7 мин.

Продукты ПЦР (фиг. 5) были выделены из агарозного геля согласно методу [25] и с помощью метода Сэнгера на автоматическом анализаторе ДНК ABI3730, производство Applied Biosystems, США, были определены их последовательности. Установленные
15 нуклеотидные последовательности были проанализированы при помощи программы BLAST [26] с целью выявления районов, относящихся к геномной ДНК картофеля. Полученные данные позволили установить, что один из фрагментов (указан стрелкой) имеет нуклеотидную последовательность, в которой совмещены последовательности экзогенной и эндогенной ДНК и которая может быть охарактеризована общей формулой X+
20 A, где

X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции, которая соответствует SEQ ID №1;

A - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, которая соответствует SEQ ID №2.

25 Данная рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, характеризующая уникальный трансформационный акт, приведший к получению генетически модифицированной линии 2904 кгс, была избрана в качестве "идентификатора" данного трансформационного события.

30 Пример 7. Протокол ПЦР для выявления предложенной идентифицирующей последовательности в геномной ДНК картофеля.

На основании анализа полной нуклеотидной последовательности X+A (SEQ ID №1+ SEQ ID №2) была предложена пара новая праймеров IDf-IDr, специфичных для данного района ДНК (фиг. 3). Праймер IDf гомологичен нуклеотидной последовательности SEQ ID №1 и представляет собой олигонуклеотид с SEQ ID №9. Праймер IDr гомологичен нуклеотидной
35 последовательности SEQ ID №2 и представляет собой олигонуклеотид с SEQ ID №10.

Проведена оптимизация протокола ПЦР для данной праймерной пары и предложены следующие условия проведения ПЦР: 35 циклов 94°C - 20 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 60 сек, окончательная полимеризация при 72°C - 7 мин.

40 В результате ПЦР-анализа геномной ДНК растений картофеля линии 2904 кгс, образцы которой были подготовлены так же, как в примере 6, проведенного в соответствии с усовершенствованным протоколом, установлено наличие фрагмента размером 351 пар нуклеотидов (фиг. 6) с последовательностью, соответствующей SEQ ID №1+ SEQ ID №2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ПЦР с праймерами IDf-IDr, производными от установленной нами в примере 6 идентифицирующей данное трансформационное
45 событие последовательности, высокоспецифично выявляет "мишень" с формулой X+A в геномной ДНК трансгенной линии 2904 кгс.

Таблица 7. Наименования и происхождение препаратов

Реактив	Фирма-производитель	Номер по каталогу фирмы
Фитоагар/Phytagar	Life Technologies, GibcoBRL	10695-039
Бактоагар/Bacto agar	Difco	0140-01
Дрожжевой экстракт/Yeast extract	Difco	0127-01-7
Триптон/Tryptone	Difco	0123-01
Сахароза/Sucrose	Sigma	S-5391

	MS-коли/MS-Salt Mixture	Life Technologies, GibcoBRL	11117-074
	ГКЗ/GA3	ICN	100288
	НУК/NAA	Life Technologies, GibcoBRL	21570-023
	БАП/ВАР (6-benzylaminopurine)	ICN	100912
5	Зеатин/Zeatin riboside	Sigma	Z 0626
	Карбенициллин/Carbencillin	Sigma	C-3416
	Канамицин/Kanamycin	Sigma	K-4378
	Цефотаксим/Cefotaxime	Sigma	C-7039
	Нитрат серебра	Sigma	S-2523
	Мио-инозитол/Мио-Inozitol	Sigma	I-3011
10	Пиридоксин/Pyridoxine HCl	Sigma	P-9755
	Тиамин/Thiamine	Sigma	T-3902
	Пантотенат Ca/Pantothenat Calcium	Calbiochem	5101
	Никотиновая кислота/Nicotinic acid	Serva	30320
	Биотин/d-Biotin	Sigma	B-3399
	Глицин/Glycine	Sigma	G-6143
15	Фолиевая кислота/Folic Acid	Sigma	F-8890
	Смола Wizard MaxiPreps	Promega	A7141
	Термополимеразы BioTaq	Диалат ЛТД, Москва	-
	Wizard PCR Preps	Promega	A7170
	Wizard Minicolumn	Promega	A7211
	Чашки Петри мм	Медполимер	-
20	Стеклянные культуральные пробирки, 25x150 мм	Sigma	C 5916
	Микроцентрифужные пробирки 1,5 мл, тип Eppendorf	Treff	96.9216.9.01
	Вегетационные контейнеры Magenta	Sigma	V 8380
	Фильтр мембранный, д. пор 0,22 мкм	Millipore	SVGS01015

Литература.

25 1. Knowles B.H. and Dow J.A.T. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* - models for their mechanism of action on the insect gut // *BioEssays*, 1993, v. 15, p. 469-476.

2. van Rie J. et al Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin // *Appl. Environ. Microbiol. Rev.*, 1990, v.56, p.1378-1385.

3. Hofe H and Whiteley H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*// *Microbiol. Rev.*,1989., v. 53, p. 242-255.

4. Feitelson J.S., Paine J., Kim L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond// *Biotechnology*, 1992, v.10, p.271-275.

30 5. Beegle C.C. and Yammamoto T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development// *Can. Ent.*, 1992, v.124, p.587-616.

6. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins.*Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Sep; 62(3): 775-806.

7. Perlak, F.J., Stone T.B., Muskopf, Y.M., Petersen, L.J., Parker, G.B., McPherson, S.A., Wyman, J., Reed G., Biever, D., Fischhoff D.A., 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.*, 22, 313-321.

8. Stewart CN Jr, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIIAc gene. *Plant Physiol.* 1996 Sep; 112(1): 121-129.

35 9. Nayak P, Basu D, Das S, Basu A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIIAc -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18; 94(6): 2111-2116.

10. патент США, 6072105, 06.06.00.

11. .

40 12. Федеральный закон РФ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности", 1996 г.(в редакции Федерального закона РФ от 12 июля 2000 г. № 96-ФЗ).

13. Федеральный закон РФ "О качестве и безопасности пищевых продуктов", 2000 г.

14. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 06.04.99 № 7 "О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников".

15. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.09.99 № 12 "О совершенствовании системы контроля за реализацией сельскохозяйственной продукции и медицинских препаратов, полученных на основе генетически модифицированных источников".

45 16. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 08.11.2000 № 13 "О нанесении информации на потребительскую упаковку пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников".

17. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 08.11.2000 № 14 "О порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников".

18. Национальный стандарт РФ №53-173.

19. Сортовые ресурсы и передовой опыт семеноводства картофеля. Б.В. Анисимов - М.: ФГНУ "Росинформагротех", 2000 - 152 с.

20. Патент на изобретение № 2231251 от 27 июня 2004 г.

50 21. Murashige T. And Skoog F., *Plant Physiology*, 1962, v.15, p.485.

22. UPOV TG\23\5 "Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability".

23. J. Sambrook, E F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

24. Ochman, H, A.S.Gerber, D.L.Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:631-623.

25. Fotadar U, Shapiro LE, Surks MI. Simultaneous use of standard and low-melting agarose for the separation and isolation of DNA by electrophoresis. *Biotechniques*. 1991 Feb;10(2):171-172.

26. .

27. Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2, 335-350, 1983.

5 28. Richins, R.D., Scholthof, H.B. and Shepherd, R.J. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group) *Nucleic Acids Res.* 15 (20), 8451-8466 (1987).

29. Winter, J., Wright, R., Duck, N., Gasser, C., Fraley, R. and Shah, D. The inhibition of petunia hsp 70 mRNA processing during CdCl₂(2) stress. *Mol. Gen. Genet.* 211, 315-319 (1988); Rensing, S.A. and Maier, U.G. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol.* 39 (1), 80-86 (1994).

30. Klee, H.J., Muskopf, Y.M. and Gasser, C.S. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210 (3), 437-442 (1987).

10 31. Harrison LA, Bailey MR, Naylor MW, Ream JE, Hammond BG, Nida DL, Burnette BL, Nickson TE, Mitsky TA, Taylor ML, Fuchs RL, Padgett SR. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr.* 1996 Mar;126(3):728-40.

32. Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. and Chua, N.H. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3 (8), 1671-1679 (1984).

33. Richins, R.D., Scholthof, H.B. and Shepherd, R.J. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group) *Nucleic Acids Res.* 15 (20), 8451-8466 (1987).

15 34. Theologis, A., et al., Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814), 816-820 (2000).

35. Perlak, F.J., Stone T.B., Muskopf, Y.M., Petersen, L.J., Parker, G.B., McPherson, S.A., Wyman, J., Reed G., Biever, D., Fischhoff D.A., 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.*, 22, 313-321.

36. Tumer, N.E., Clark, W.G., Tabor, G.J., Hironaka, C.M., Fraley, R.T. and Shah, D.M. The genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase are expressed differentially in petunia leaves. *Nucleic Acids Res.* 14 (8), 3325-3342 (1986).

37. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1 (6), 561-573, 1982.

20

Перечень последовательностей.

SEQ ID №1 - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции:

5'-GCTGCTCGAGTGGAGGCCTCATCTAAGCCCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
 25 GTCGAAATAAAGATTTCCGAATTAGAATAATTTGTTTATTGCTTTTCGCCTATAAATACGACG
 GATCGTAATTTGTCGTTTTATCAAAATGTACTTTTCATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTACA
 TTTTTGAATTGAAAAAAATTTGGTAATTAATCTTTCTTTTCTCCATATTGACCATCATACTCAT
 TGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAATATATCC -3'

30 SEQ ID№2 - нуклеотидная последовательность фланкирующего участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета:

5' - AAATCGAAAAACAGTGCGCCAGTAACGACTAATACCATTTGAATTAGTCGTC

SEQ ID №3 - олигонуклеотидный праймер pr1:

5' - CTCGACAGTTCTACCACTAAGGATG - 3'

35 SEQ ID№4 - олигонуклеотидный праймер pr2:

5' - GACTAAACTCCACSTTTGTGACGCC - 3'

SEQ ID №5 - олигонуклеотидный праймер F1:

5' - GCTGCTCGAGTGGAGGCCTCATCTAAGC - 3'

SEQ ID№6 - олигонуклеотидный праймер R1:

5' -CTCAACAAGGTCAGGGTACAGAGTCTCC - 3'

40 SEQ ID №7 - олигонуклеотидный праймер F2:

5' - GCTTTTCGCCTATAAATACGACGGATCG - 3'

SEQ ID №8 - олигонуклеотидный праймер R2:

5' - GCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAG - 3'

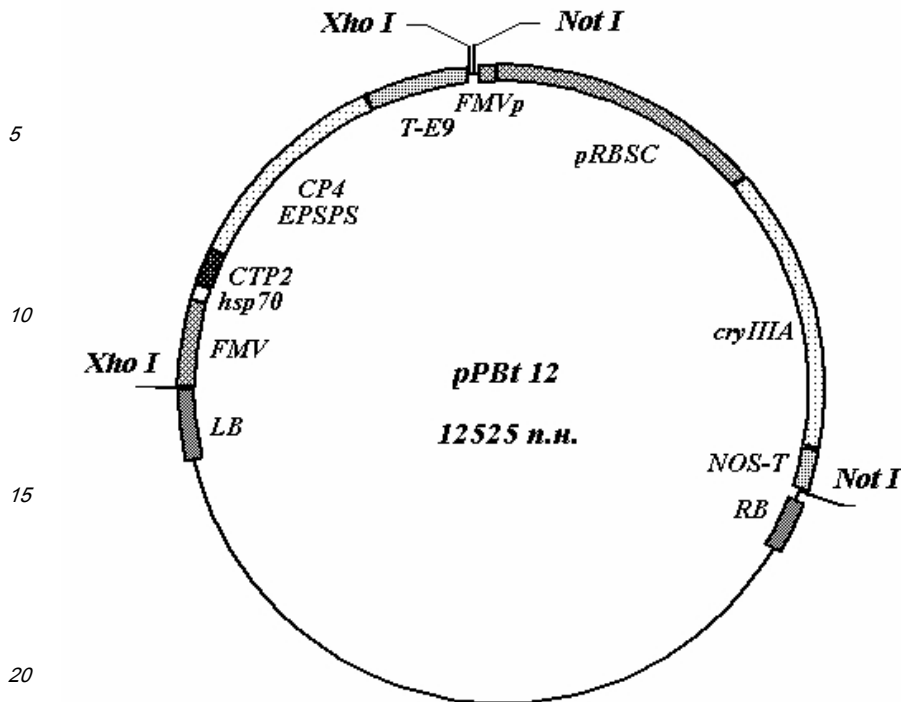
SEQ ID №9 - олигонуклеотидный праймер IDf:

45 5' - GCTTTTCGCCTATAAATACGACGGATCG - 3'

SEQ ID №10 - олигонуклеотидный праймер IDr:

5' - GACGACTAATTCAAATGGTATTAG - 3'

ФИГ №1 Основные генетические элементы трансформационного вектора pPBt12



Обозначения на рисунке:

LB - левая фланкирующая последовательность плазмиды *Ti A.tumifasciens* [27];

FMV - 35S промотор вируса мозаики норичника [28];

Hsp70 - нетранслируемая лидерная последовательность белка теплового шока петунии hsp 70 [29];

CTP2 - N-терминальный хлоропластный транзитный пептид гена EPSPS *Arabidopsis thaliana* [30]

CP4 EPSPS - кодирующая область маркерного гена (ген *aroA*) из бактерии *Agrobacterium sp.ssp.CP4* [31],

T-E9 - 3'-нетранслируемый район гена малой субъединицы E9 RuBisCo гороха - терминатор [32]

FMVp - часть энхансерной последовательности промотора 35S вируса мозаики норичника [33].

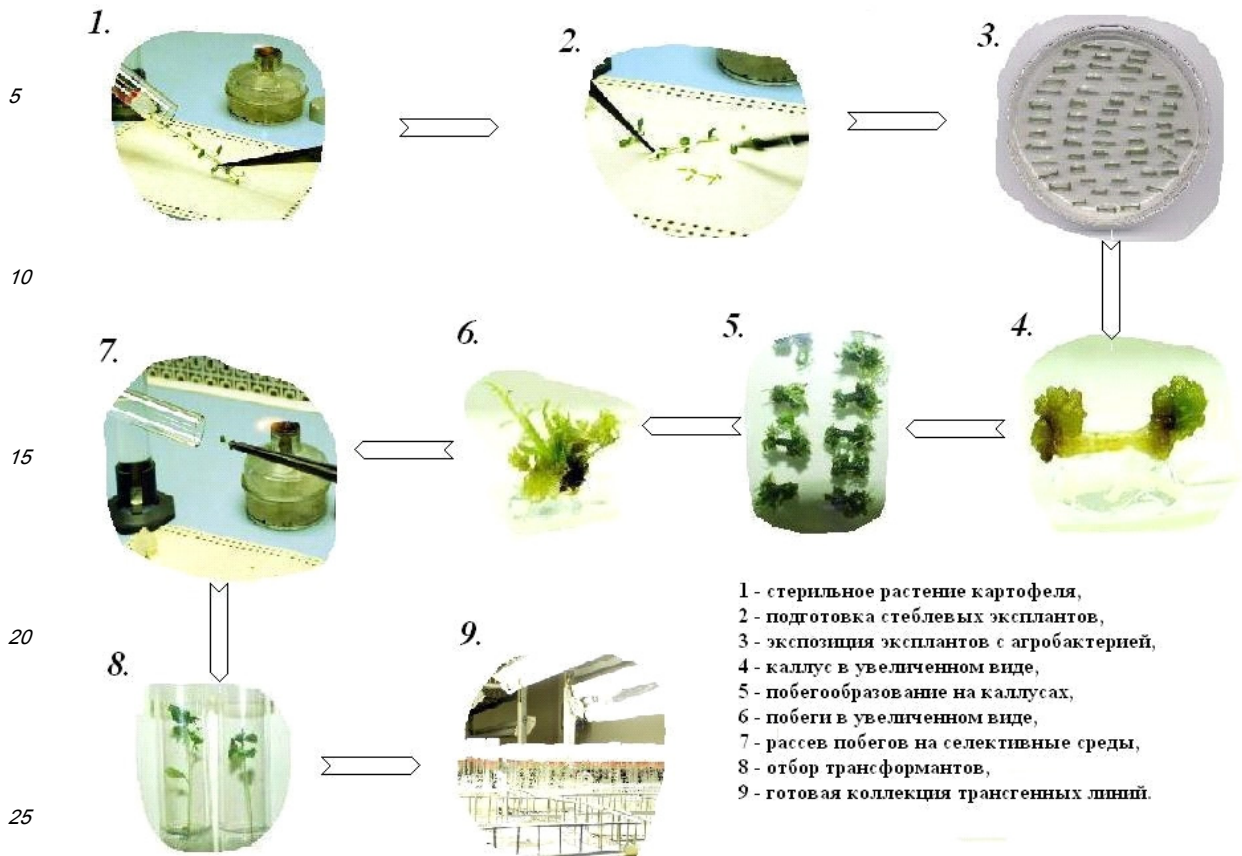
pRBSC - промотор гена малой субъединицы 1A RuBisCo из *Arabidopsis thaliana* [34].

cryIIIa - кодирующая последовательность целевого гена *cryIIIa* [35].

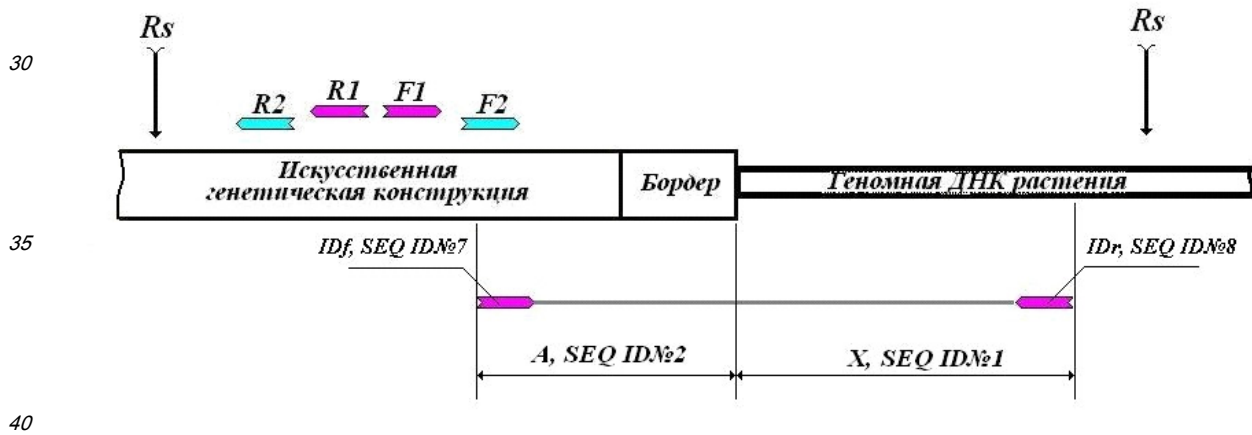
NOS-T - 3'-терминальная область гена нопалин синтетазы (NOS) *Arabidopsis thaliana* [36].

RB - Правая фланкирующая последовательность -плазмиды *Ti A.tumifasciens* [37].

ФИГ№2 Схема проведения трансформации картофеля.



Фиг. 3. Схема получения уникального ПЦР-идентификатора трансгенной линии.



Обозначения на рисунке:

R_s - сайт разрезания рестриктазой Rsa I;

F₁, R₁ - праймерная пара для первой ступени инверсной ПЦР;

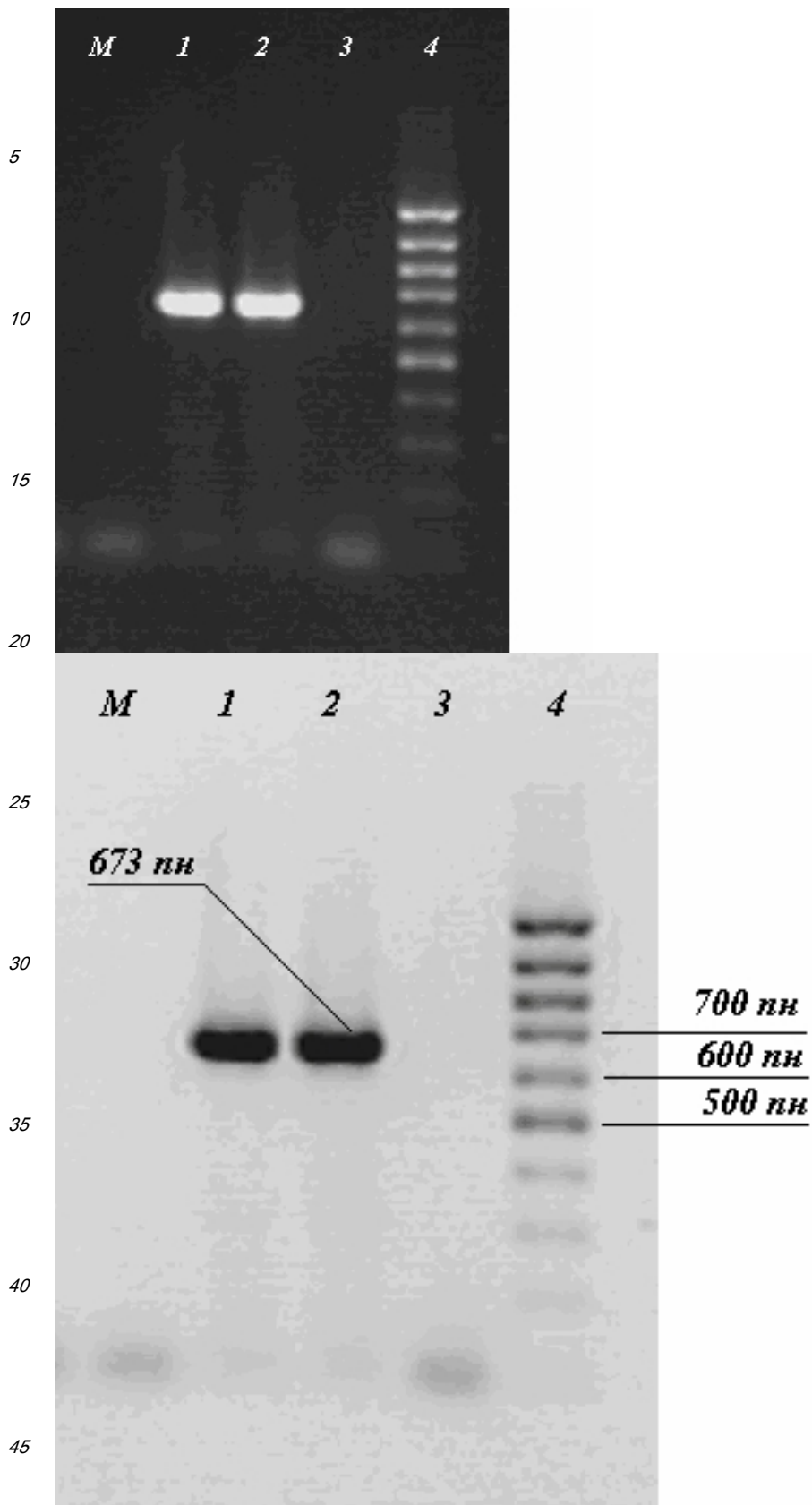
F₂, R₂ - праймерная пара для второй ступени инверсной ПЦР;

Бордер - фланкирующая последовательность вектора;

ID_f, ID_r - праймерная пара для идентификационной ПЦР,

A, X - фрагменты идентификатора трансгенной линии (по п.1 формулы)

ФИГ№ 4 Типичный электрофоретический анализ продуктов ПЦР с праймерной системой pR1-pR2 на ДНК из коллекции модифицированных линий картофеля.



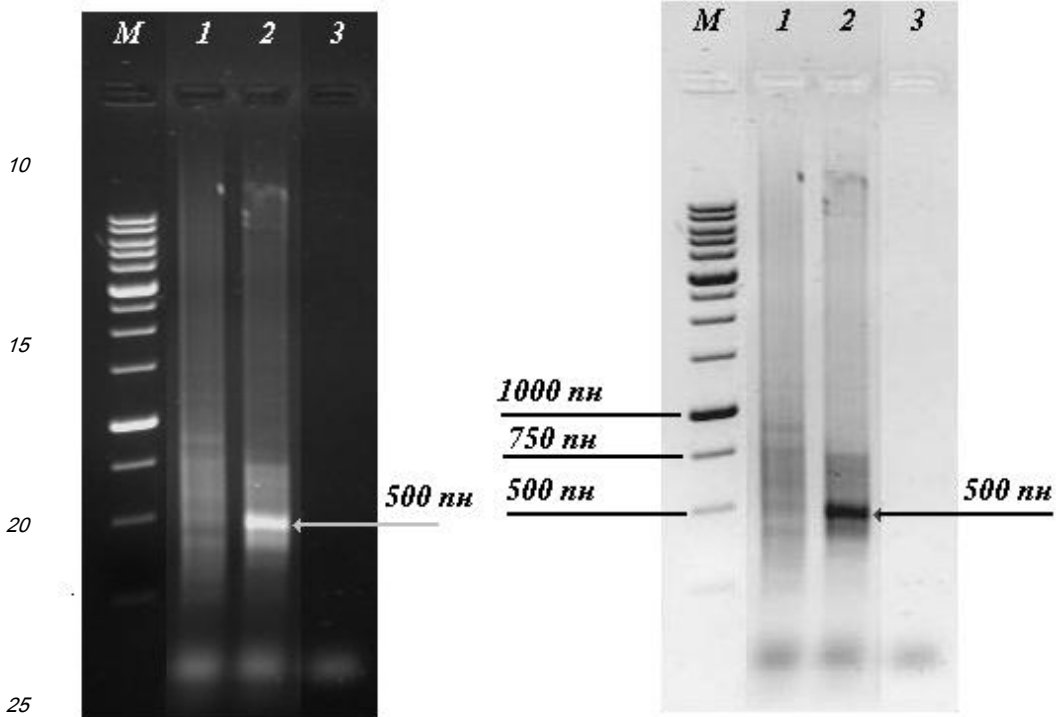
groupTop0groupRight0groupBottom0fFlipH0fFlipV0posh0posrelh2posv0posrelv2fLayoutInCell0
fLayoutInCell0

- 50 Обозначения на рисунке:
 1 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК),
 2, 3 - ПЦР на 2 независимых препаратах ДНК модифицированного картофеля,
 4 - ПЦР на ДНК контрольного картофеля,

5 - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

Стрелка (673 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта. Справа указаны положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

ФИГ№ 5. Электрофоретический анализ продуктов инверсной ПЦР с праймерной системой F1-R1 на ДНК модифицированной линии картофеля 2904 кгс.



Обозначения на рисунке:

М - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

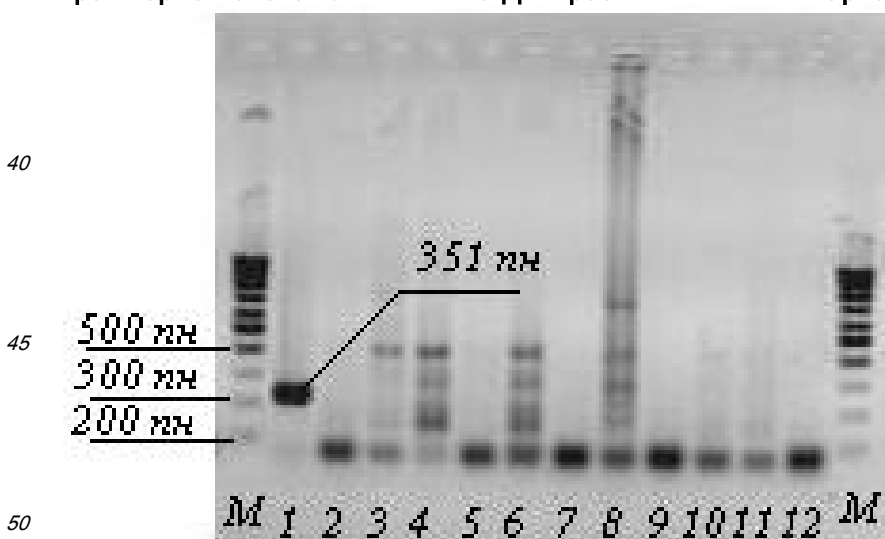
1 - ПЦР на препарате ДНК немодифицированного контрольного картофеля,

2 - ПЦР на препарате ДНК модифицированного картофеля линии 2904кгс,

3 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК),

Стрелка справа (500 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта. Слева указаны положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

ФИГ№ 6. Электрофоретический анализ продуктов идентификационной ПЦР с праймерной системой IDf-IDg на ДНК различных линий картофеля.



Обозначения на рисунке:

М - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

1 - ПЦР на препарате ДНК модифицированного картофеля линии 2904кгс,

2-10 - ПЦР на препаратах ДНК других линий модифицированного картофеля,
11 - ПЦР на препарате ДНК контрольного картофеля сорта Елизавета,
12 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК).
Стрелка (351 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта. Слева указаны

5 положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

Формула изобретения

1. Рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, характеризующая продукт,
полученный в результате уникального трансформационного акта между генетической
10 конструкцией, включающей ген *cryIIIa*, и геномной ДНК картофеля сорта Елизавета,
обеспечивающая экспрессию названного гена на уровне, достаточном для проявления у
растения признака устойчивости к колорадскому жуку, и имеющая общую формулу X-A, где
X - часть нуклеотидной последовательности введенной генетической конструкции,
соответствующая SEQ ID №1, а A - нуклеотидная последовательность фланкирующего
15 участка геномной ДНК картофеля сорта Елизавета, соответствующая SEQ ID №2.

2. Клетка растения картофеля, продуцирующая белок *cryIIIa*, которая содержит
рекомбинантную полинуклеотидную последовательность по п.1.

3. Растение устойчивого к колорадскому жуку трансгенного картофеля, содержащее
клетки по п.2.

20 4. Вегетативное потомство растения по п.3, сохранившее в ряду поколений
генотипический признак родительского организма, контролируемый по наличию в геномной
ДНК рекомбинантной полинуклеотидной последовательности по п.1.

5. Применение полинуклеотидной последовательности по п.1 для идентификации клетки
по п.2, растения по п.3, вегетативного потомства по п.4.

25

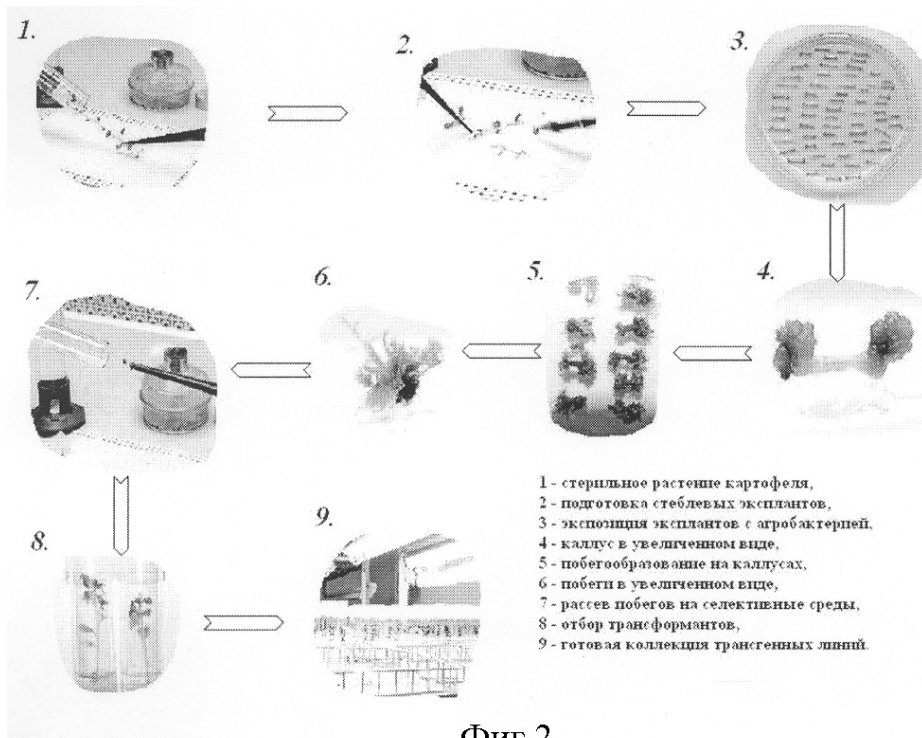
30

35

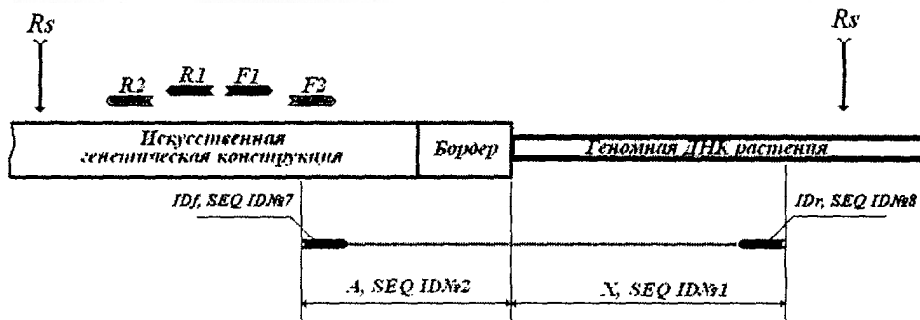
40

45

50

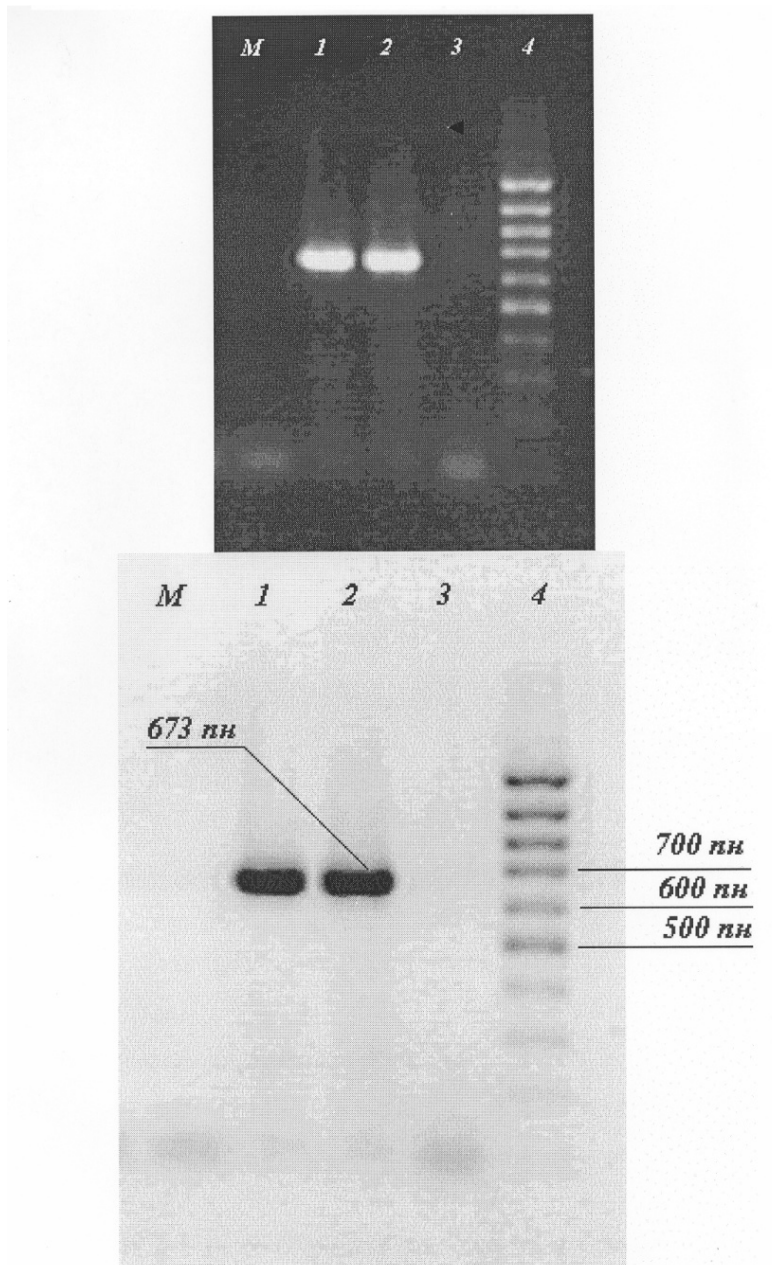


Фиг. 2



Rs - сайт разрезания рестриктазой *Rsa I*;
F1, R1 - праймерная пара для первой ступени инверсной ПЦР;
F2, R2 - праймерная пара для второй ступени инверсной ПЦР;
 Бордер - фланкирующая последовательность вектора;
IDf, IDr - праймерная пара для идентификационной ПЦР,
A, X - фрагменты идентификатора трансгенной линии (по п.1 формулы)

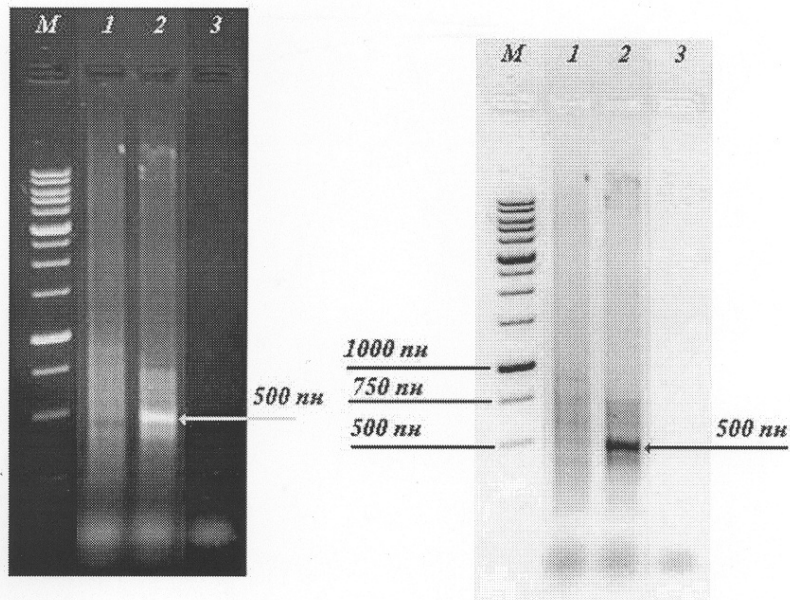
Фиг. 3



1 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК),
 2, 3 - ПЦР на 2 независимых препаратах ДНК модифицированного картофеля,
 4 - ПЦР на ДНК контрольного картофеля,
 5 - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

Стрелка (673 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта.
 Справа указаны положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

Фиг.4



Обозначения на рисунке:

M - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

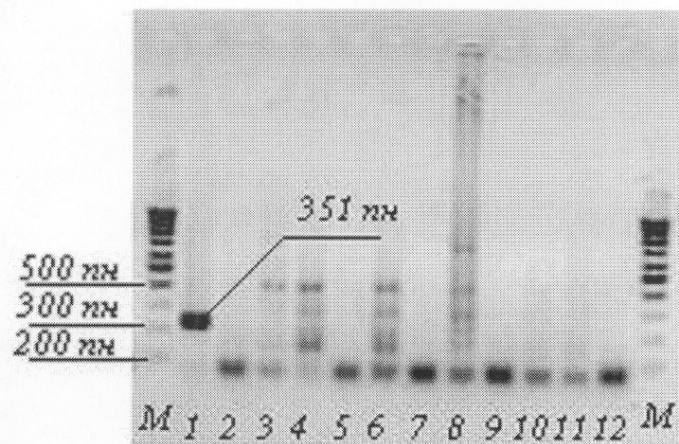
1 - ПЦР на препарате ДНК немодифицированного контрольного картофеля,

2 - ПЦР на препарате ДНК модифицированного картофеля линии 2904KGS,

3 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК),

Стрелка справа (500 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта. Слева указаны положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

Фиг.5



Обозначения на рисунке:

M - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp (Fermentas, #SM0241).

1 - ПЦР на препарате ДНК модифицированного картофеля линии 2904кгс,

2-10 - ПЦР на препаратах ДНК других линий модифицированного картофеля,

11 - ПЦР на препарате ДНК контрольного картофеля сорта Елизавета,

12 - контроль качества реакционной смеси (ПЦР в отсутствие матричной ДНК).

Стрелка (351 пн) указывает на положение искомого ПЦР-продукта.

Слева указаны положения фрагментов маркера молекулярной массы ДНК

Фиг.6