



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2003 128 987** ⁽¹³⁾ **A**
(51) МПК⁷ **C 07 H 21/04, C 07 K 14/21, C**
12 N 15/82

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: 2003128987/13, 28.02.2002

(30) Приоритет: 28.02.2001 US 09/797,238

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2005 Бюл. № 6

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 29.09.2003

(86) Заявка РСТ:
US 02/06310 (28.02.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 02/06860 (06.09.2002)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",
пат.пов. Г.Б. Егоровой

(71) Заявитель(и):
БОРД ОФ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ НЕБРАСКА (US)

(72) Автор(ы):
ВИКС Дональд П. (US),
ВОНГ Ксиао-Зуо (US),
ГЕРМАН Патриция Л. (US)

(74) Патентный поверенный:
Егорова Галина Борисовна

(54) СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ
ОРГАНИЗМОВ, ДИКАМБА-РАЗРУШАЮЩИХ

Формула изобретения

1. Выделенная молекула ДНК, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

a. аминокислотной последовательности, включающей SEQ ID NO:5;

b. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент SEQ ID NO:5; и

c. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична SEQ ID NO:5 и которая обладает дикамба-разрушающей активностью ферредоксина.

2. Молекула ДНК по п.1, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

3. Молекула ДНК по п.1, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:4.

4. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин по п.1, функционально связанную с последовательностями, регулирующими экспрессию.

5. ДНК-конструкция по п.4, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

6. ДНК-конструкция по п.4, включающая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:4.

7. Выделенный и по крайней мере частично очищенный дикамба-разрушающий

ферредоксин, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а. аминокислотной последовательности, включающей SEQ ID NO:5;

б. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент SEQ ID NO:5; и

с. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична в отношении SEQ ID NO:5;

при этом указанная аминокислотная последовательность обладает ферментативной активностью дикамба-разрушающего ферредоксина.

8. Дикамба-разрушающий ферредоксин по п.8, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

9. Выделенная молекула ДНК, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а. аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9;

б. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент аминокислотной последовательности, указанной в (а); и

с. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, указанной в (а), и которая обладает дикамба-разрушающей активностью редуктазы.

10. Молекула ДНК по п.9, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

11. Молекула ДНК по п.9, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

12. Молекула ДНК по п.9, включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8.

13. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу по п.9, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессией.

14. ДНК-конструкция по п.13, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

15. ДНК-конструкция по п.13, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.

16. ДНК-конструкция по п.13, включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8.

17. Выделенная и по крайней мере частично очищенная дикамба-разрушающая редуктаза, включающая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а. аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9;

б. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент аминокислотной последовательности, указанной в (а); и

с. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, указанной в (а);

при этом указанная аминокислотная последовательность обладает ферментативной активностью дикамба-разрушающей редуктазы.

18. Дикамба-разрушающая редуктаза по п.17, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

19. Дикамба-разрушающая редуктаза по п.17, включающая аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:9.

20. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессию, и с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу в органеллы растительной клетки, при этом указанная дикамба-разрушающая оксигеназа включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

a. SEQ ID NO:3;

b. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент SEQ ID NO:3; и

c. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична SEQ ID NO:3 и которая обладает дикамба-разрушающей активностью оксигеназы.

21. ДНК-конструкция по п.20, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая дикамба-разрушающую оксигеназу, включает SEQ ID NO:2.

22. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессию, и с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, который направляет указанный дикамба-разрушающий ферредоксин в органеллы растительной клетки, при этом указанный дикамба-разрушающий ферредоксин включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a. аминокислотной последовательности, включающей SEQ ID NO:5;

b. аминокислотной последовательности, которая представляет собой биологически активный фрагмент SEQ ID NO:5; и

c. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична SEQ ID NO:5 и которая обладает дикамба-разрушающей активностью ферредоксина.

23. ДНК-конструкция по п.22, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая дикамба-разрушающий ферредоксин, включает SEQ ID NO:4.

24. ДНК-конструкция по п.22, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая дикамба-разрушающий ферредоксин, содержит кодоны, подобранные для оптимизированной экспрессии в двудольных растениях.

25. ДНК-конструкция, включающая последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессию и с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую редуктазу в органеллы растительной клетки, при этом указанная дикамба-разрушающая редуктаза включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a. аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9;

b. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент аминокислотной последовательности, указанной в (a); и

c. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, указанной в (a) и которая обладает дикамба-разрушающей активностью редуктазы.

26. ДНК-конструкция по п.25, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая дикамба-разрушающую редуктазу, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8.

27. ДНК-конструкция, кодирующая дикамба-разрушающую O-метилазу, включающую последовательность ДНК, которая функционально связана с последовательностями, регулируемыми экспрессию, при этом указанная последовательность ДНК кодирует

a. дикамба-разрушающую оксигеназу, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. SEQ ID NO:3;

ii. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент SEQ ID NO:3; и

iii. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична SEQ ID NO:3 и которая обладает дикамба-разрушающей активностью оксигеназы;

b. дикамба-разрушающий ферредоксин, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. аминокислотной последовательности, включающей SEQ ID NO:5;

ii. аминокислотной последовательности, которая представляет собой биологически активный фрагмент SEQ ID NO:5; и

iii. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 65% идентична SEQ ID NO:5 и которая обладает дикамба-разрушающей активностью ферредоксина; и

c. дикамба-разрушающую редуктазу, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

i. аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9;

ii. аминокислотной последовательности, которая представляет собой ферментативно активный фрагмент аминокислотной последовательности, указанной в (a); и

iii. аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, указанной в (a), и которая обладает дикамба-разрушающей активностью редуктазы.

28. ДНК-конструкция по п.27, отличающаяся тем, что указанная конструкция дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу в органеллы растительной клетки.

29. ДНК-конструкция по любому из пп.20, 22, 25 или 27, отличающаяся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

30. ДНК-конструкция по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция представляет собой вектор.

31. Трансгенная клетка-хозяин, включающая ДНК-конструкцию по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28.

32. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9.

33. Трансгенная клетка-хозяин по п.32, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую редуктазу в органеллы растительной клетки.

34. Трансгенная клетка-хозяин по п.33, отличающаяся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

35. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

36. Трансгенная клетка-хозяин по п.35, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанный дикамба-разрушающий ферредоксин в органеллы растительной клетки.

37. Трансгенная клетка-хозяин по п.36, отличающаяся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

38. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессией, и с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу в органеллы растительной клетки, при этом указанная дикамба-разрушающая оксигеназа имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

39. Трансгенная клетка-хозяин по п.38, отличающаяся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

40. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, дикамба-разрушающий ферредоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и дикамба-разрушающую редуктазу, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9.

41. Трансгенная клетка-хозяин по п.40, отличающаяся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу, указанный дикамба-разрушающий ферредоксин и указанную дикамба-разрушающую редуктазу в органеллы растительной клетки.

42. Трансгенная клетка-хозяин по п.41, отличающаяся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

43. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, которая представляет собой растительную клетку.

44. Трансгенная клетка-хозяин по п.31, которая представляет собой микроорганизм.

45. Трансгенное растение или часть растения, включающее одну или более клеток, включающих ДНК-конструкцию по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28.

46. Трансгенное растение или часть растения по п.45, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую редуктазу, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9.

47. Трансгенное растение или часть растения по п.46, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую редуктазу в органеллы растительной клетки.

48. Трансгенное растение или часть растения по п.47, отличающееся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

49. Трансгенное растение или часть растения по п.45, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающий ферредоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.

50. Трансгенное растение или часть растения по п.49, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанный дикамба-разрушающий ферредоксин в органеллы растительной клетки.

51. Трансгенное растение или часть растения по п.50, отличающееся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

52. Трансгенное растение или часть растения по п.45, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, функционально связанную с последовательностями, регулируемыми экспрессию, и с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу в органеллы растительной клетки, где указанная дикамба-разрушающая оксигеназа включает аминокислотную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

53. Трансгенное растение или часть растения по п.52, отличающееся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

54. Трансгенное растение или часть растения по п.45, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция включает последовательность ДНК, кодирующую дикамба-разрушающую оксигеназу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, дикамба-разрушающий ферредоксин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и дикамба-разрушающую редуктазу, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9.

55. Трансгенное растение или часть растения по п.54, отличающееся тем, что указанная ДНК-конструкция дополнительно включает сигнальный пептид, который направляет указанную дикамба-разрушающую оксигеназу, указанный дикамба-разрушающий

ферредоксин и указанную дикамба-разрушающую редуктазу в органеллы растительной клетки.

56. Трансгенное растение или часть растения по п.55, отличающееся тем, что указанный сигнальный пептид кодируется SEQ ID NO:19.

57. Трансгенное растение или часть растения по п.56, отличающаяся тем, что растение является двудольным или однодольным растением, которое устойчиво к дикамбе.

58. Способ борьбы с сорняками на плантации, содержащей устойчивое к дикамбе трансгенное растение по п.45, включающий нанесение дикамбы на плантацию в количестве, эффективном для борьбы с сорняками на плантации.

59. Способ очистки материала, содержащего дикамбу, включающий нанесение дикамба-разрушающего трансгенного микроорганизма по п.44, на материал в количестве эффективном для разрушения по крайней мере части дикамбы в материале.

60. Способ очистки материала, содержащего дикамбу, включающий нанесение дикамба-разрушающего ферредоксина по п.7, дикамба-разрушающей редуктазы по п.17 или дикамба-разрушающей O-деметилазы, кодируемой ДНК-конструкцией по п.27, на материал в количестве эффективном для разрушения по крайней мере части дикамбы в материале.

61. Способ селекции трансформированных растительных клеток, включающий:

получение популяции растительных клеток;

трансформацию по крайней мере некоторых растительных клеток из популяции растительных клеток ДНК-конструкцией по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28, так что они станут устойчивыми к дикамбе;

выращивания полученной популяции растительных клеток в культуральной среде, содержащей дикамбу в концентрации, выбранной так, что трансформированные клетки будут расти, а нетрансформированные клетки расти не будут.

62. Способ селекции трансформированных растений, включающий

получение популяции растений, которая может включать растения, которые были трансформированы ДНК-конструкцией по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28, так что они стали устойчивыми к дикамбе; и

нанесение дикамбы на популяцию растений в количестве дикамбы выбранном так, что трансформированные растения будут расти, а рост нетрансформированных растений будет ингибироваться.

63. Способ селекции и скрининга трансформированных клеток-хозяев, целых организмов или частей организма, включающий

получение популяции клеток-хозяев, целых организмов или частей организмов, которые могут включать клетки-хозяев, интактные организмы или части организмов которые были трансформированы ДНК-конструкцией по любому из пп.4-6, 13-16 или 20-28, так что они стали разрушать дикамбу;

контактирование популяции клеток-хозяев, целых организмов или частей организмов с дикамбой; и

выявление наличия или уровня флуоресценции вследствие присутствия 3,6-дихлорсалициловой кислоты, причем 3,6-дихлорсалициловая кислота генерируется в клетках-хозяевах, целых организмах или частях организмов в результате разрушения дикамбы.