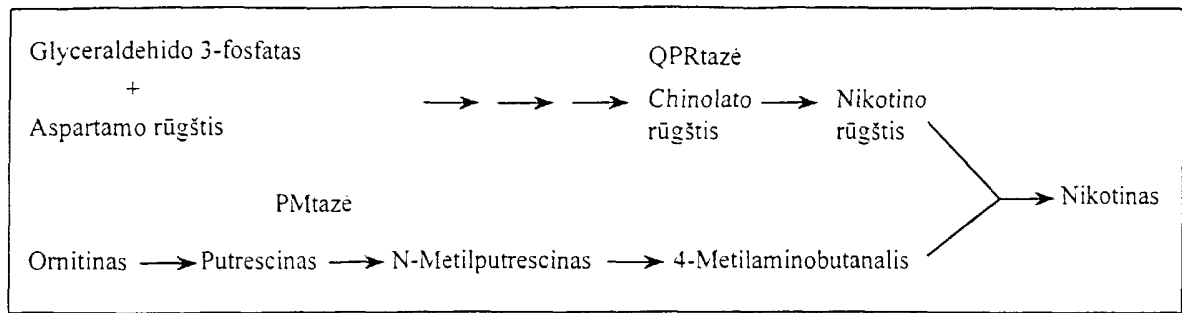


- (11) Patento numeris: **4706** (51) Int. Cl.⁷ **C12N 15/54**
C12N 15/82
(21) Paraiškos numeris: **99-142** **C12N 15/70**
C12N 15/11
(22) Paraiškos padavimo data: **1999 12 10** **C12N 5/10**
A01H 5/00
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 06 26**
(45) Patento paskelbimo data: **2000 09 25**
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US 98/11893**
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 06 10**
(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 12 10**
(31, 32, 33) Prioritetas: **049471, 1997 06 12, US**
(72) Išradėjas:
Mark A. Conkling, US
Nandini Mendu, US
Wen Song, US
(73) Patento savininkas:
NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY,
103 Bynum Hall, Campus Box 7003, Raleigh, NC 27695-7003, US
(74) Patentinis patikėtinis:
Marija Vanda Antanaitienė, 43, a/d 3197, 2022 Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
Fosforibozilo chinolato transferazės ekspresijos reguliavimas
(57) Referatas:



Išradimas susijęs su DNR, koduojančia augalo fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) enzimą, tokios DNR sukūrimu ir fosforibozilo chinolato transferazės ekspresijos pakeitimo būdu.

Išradimo sritis

Išradimas liečia augalo fosforibozilo chinolato transferazę (QPRtazė) ir DNR, koduojančią šį enzymą. Ypač šis išradimas liečia DNR, koduojančią fosforibozilo chinolato transferazę, kad galima būtų gauti transgeninius augalus, turinčius genetiškai pakeistus nikotino lygius, ir tokiu būdu gautus augalus.

Išradimo sukūrimo prielaidos

Domėjimosi objektas yra tabako su sumažintu nikotino lygiu gamyba, atsižvelgiant į įprastą nikotino prigimtį. Papildomai, tabako augalai su ypač žemu nikotino susidarymo lygiu arba visai be nikotino yra patrauklūs kaip recipientai transgenų ekspresijai komerciškai vertingai produkcijai, tokiai kaip medikamentai, kosmetiniai komponentai arba maisto priedai. Nikotino pašalinimui iš tabako yra taikomi įvairūs būdai. Vis dėlto, dauguma šių būdų kartu su nikotinu pašalina ir kitus ingredientus, tuo būdu nepalankiai paveikdami tabaką. Klasikinė pasėlių veisimo metodika gavo tabako augalus su žemesniu nikotino lygiu (apytikriai 8%) būdingu laukinėms tabako augalų rūšims. Tabako augalai ir tabakas, turintys dar mažesnę nikotino kiekį, yra pageidaujami.

Vienas iš būdų sumažinti biologinių produktų lygį yra reikiamų fermentų kiekio sumažinimas biosintezės, vedančios į produktą, kelyje. Kur tiriamas fermentas natūraliai yra reakcijos greitį ribojančiu kiekiu (kitų fermentų atžvilgiu), bet kokia šio

fermento pertekliaus redukcija sumažins galutinio produkto produkciją. Jeigu fermento kiekis nėra paprastai greitį ribojantis, jo buvimas ląstelėje turi būti redukuotas iki greitį ribojančio kiekio, siekiant sumažinti biosintezės išėigą. Atvirkščiai, jei natūraliai paplitęs fermento kiekis yra greitį ribojantis, tada bet koks fermento aktyvumo padidėjimas sąlygos biosintezės produkto kiekio padidėjimą.

Nikotinas pirmiausiai yra suformuojamas tabako augalo šaknyse ir vėliau yra perkeliamas į lapus, kur jis yra saugomas (Tso, *Physiology and Biochemistry of Tobacco plants*, p. 233-34, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pa. (1972)). Privaloma nikotino biosintezės pakopa yra nikotino rūgšties susidarymas iš chinolato rūgšties, kuri yra katalizuojama fosforibozilo chinolato transferazės fermentu ("QPRtazė"). QPRtazė pasirodo esanti reakcijos greitį ribojantis fermentas nikotino rūgšties tiekimo nikotino sintezei tabake etape. Žiūrėti, pav., Feth ir kt., "Regulation in Tobacco Callus of enzyme Activities of the Nicotine Pathway", *Planta*, 168, p. 402-07 (1986); Wagner ir kt., "The Regulation of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway", *Physiol. Plant.*, 68, p. 667-72 (1986). Nikotino lygių pakeitimas tabako augaluose putrescino metilo transferazės (PMtazė) ekspresijos antisensiniu reguliavimu yra pasiūlytas JAV patentuose 5,369,023 ir 5,260,205 Nakatini ir Malik, Wahad ir Malik, PCT paraiška WO 94/28142 aprašo DNR koduojančią PMT ir sensinės bei antisensinės PMT konstrukcijos naudojimą.

IŠRADIMO SANTRAUKA

Šio išradimo pirmasis aspektas yra išskirta DNR molekulė, apimanti seką SEQ ID NO:1: DNR sekos, kurios koduoja fermentą, turintį seką SEQ ID No:2: DNR sekos, kurios hibridizuojasi į tokią DNR ir kurios koduoja fosforibozilo chinolato transferazės fermentą; ir DNR sekos, kurios skiriasi nuo anksčiau paminėtos DNR

dėl genetinio kodo degeneracijos. Peptidas, koduojamas tokia DNR, yra dar vienas išradimo aspektas.

Kitas šio išradimo aspektas yra DNR konstrukcija, turinti promotorių, veikiantį augalo ląstelėje, ir DNR segmentą, koduojantį fosforibozilo chinolato transferazės fermentą, esantį pasroviui nuo promotoriaus ir funkcionaliai susijusį su juo. DNR, koduojanti fermentą, gali būti antisensinėje arba sensinėje kryptyje.

Kitas šio išradimo aspektas yra transgeninės augalo ląstelės, turinčios sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) ekspresiją, gamybos būdas, sukuriant tokio tipo augalo ląstelę, kuri ekspresuotų fosforibozilo chinolato transferazę: transformuojant augalo ląstelę egzogenine DNR konstrukcija, turinčia promotorių, ir DNR, turinčią dalį sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR.

Kitas šio išradimo aspektas yra transgeninis augalas iš rūšių *Nicotiana*, turintis sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu. Tokių augalų ląstelės turi DNR konstrukciją, kuri apima segmentą DNR sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR.

Kitas šio išradimo aspektas yra fosforibozilo chinolato transferazės geno ekspresijos sumažinimo būdas augalo ląstelėje, užauginant augalo ląstelę transformuotą taip, kad turėtų egzogeninę DNR, kur transkribuota egzogeninės DNR vija yra komplementari (papildančioji) fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, kuri yra endogeninė ląstelei. Papildančiosios vijos transkripcija sumažina endogeninio fosforibozilo chinolato geno ekspresiją.

Kitas šio išradimo aspektas yra tabako augalo, turinčio sumažintus nikotino lygius tabako augalo lapuose, gamybos būdas, užauginant tabako augalą su ląstelėmis.

turinčiomis egzogeninę DNR seką, kur transkribuota egzogeninės DNR sekos vija yra komplementari (papildančioji) endogeninei fosforibozilo chinolato transferazės informacinei RNR ląstelėse.

Kitas šio išradimo aspektas yra transgeninės augalo ląstelės, turinčios padidintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) ekspresiją, gamybos būdas, transformuojant augalo ląstelę taip, kad ji išreikštų fosforibozilo chinolato transferazę egzogenine DNR konstrukcija, kuri apima DNR seką, koduojančią fosforibozilo chinolato transferazę.

Kitas šio išradimo aspektas yra transgeninis *Nicotiana* augalas, turintis padidintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) ekspresiją, kur transgeninio augalo ląstelės turi egzogeninę DNR seką, koduojančią augalo fosforibozilo chinolato transferazę.

Kitas šio išradimo aspektas yra fosforibozilo chinolato transferazės geno ekspresijos augalo ląstelėje padidinimo būdas, užauginant augalo ląstelę transformuotą taip, kad ji turėtų egzogeninę DNR, koduojančią fosforibozilo chinolato transferazę.

Kitas šio išradimo aspektas yra tabako augalo, turinčio padidintus nikotino lygius lapuose, gamybos būdas, užauginant tabako augalą, turintį ląsteles su egzogenine DNR seka, koduojančia fosforibozilo chinolato transferazę funkcionuojančią ląstelėse.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Figūra 1 rodo biosintezės kelią vedantį į nikotiną. Fermento aktyvumai, kuriuos reguliuoja *Nic1* ir *Nic2*, yra QPRtazė (fosforibozilo chinolato transferazė) ir PMtazė (putrescino metilo transferazė).

Figūra 2A pateikia branduolio rūgšties seką *NtQPT1* cDNR (SEQ ID NO:1), su koduojančia seka (SEQ ID NO:3) parodyta didžiosiomis raidėmis.

Figūra 2B pateikia išvestą aminorūgšties seką (SEQ ID NO:2) tabako QPRtazės, koduotos *NtQPT1* cDNR.

Figūra 3 pateikia išvestą *NtQPT1* aminorūgšties seką ir susijusias *Rhodospirillum rubrum*, *Mycobacterium lepre*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* ir *Saccharomyces cerevisiae* sekas.

Figūra 4 rodo *Escherichia coli* mutanto, kuriam trūksta fosforibozilo chinolato transferazės (TH265), papildymo su *NtQPT1* cDNR rezultatus. Ląstelės buvo transformuotos ekspresijos vektoriumi, pernešančiu *NtQPT1*; Transformuotų TH265 ląstelių, ekspresuotų *NtQPT1* minimalioje terpėje, kuriai trūksta nikotino rūgšties, augimas, parodė, kad *NtQPT1* koduoja QPRtazę.

Figūra 5 palygina nikotino lygius ir santykinius pastovios būsenos *NtQPT1* mRNR lygius *Nic1* ir *Nic2* tabako mutantuose: laukinis tipas Burley 21 (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*); *Nic1* Burley 21 (*nic1/nic1 Nic2/Nic2*); *Nic2* Burley 21 (*Nic1/Nic1 nic2/nic2*); ir *Nic1 Nic2* Burley 21 (*nic1/nic1 nic2/nic2*). Vientisos linijos nurodo mRNR transkripto lygius; išskaidytos linijos nurodo nikotino lygius.

Figūra 6 vaizduoja santykinius *NtQPT1* mRNR lygius per tam tikrą laiką tabako augaluose nupjautomis viršūnėmis palyginus su kontroliniais nenupjautomis viršūnėmis augalais. Vientisos linijos nurodo mRNR transkripto lygius; išskaidytos linijos nurodo nikotino lygius.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Tabako augaluose nikotinas yra gaminamas kondensuojantis nikotino rūgščiai ir 4-metilaminobutanaliui. Biosintezės kelias, pasibaigiantis nikotino gamyba yra pavaizduotas **Figūroje 1**. Du lokuso reguliatoriai (*Nic1* ir *Nic2*) veikia kaip bendrai vyraujantys nikotino gamybos reguliatoriai. Viengubų ir dvigubų *Nic* mutantų šaknų fermentų analizės rodo, kad dviejų fermentų, fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) ir putrescino metilo transferazės (PMtazė), aktyvumai yra tiesiogiai proporcingi nikotino biosintezės lygiams. Fermentų aktyvumų tabako audiniuose (šaknyse ir kaliuje) palyginimas su skirtingais nikotino sintezės produktyvumais parodo, kad QPRtazės aktyvumas yra griežtai koreliuojamas su nikotino kiekiu (Wagner ir Wagner, *Planta* 165:532 (1985)). Saunders ir Bush (*Plant Physiol* 64:236 (1979)) parodė, kad QPRtazės lygis žemo nikotino lygio mutantų šaknyse yra proporcingas nikotino lygiams lapuose.

Šis išradimas apima naują cDNR seką (**SEQ ID NO:1**), koduojančią **SEQ ID NO:2** augalo fosforibozilo chinolato transferazę (QPRtazė). Kadangi QPRtazės veikimas yra griežtai koreliuojamas su nikotino kiekiu, transgeninių tabako augalų konstravimas, kuriuose QPRtazės lygiai augalo šaknyse (palyginus su lygiais laukinio tipo augaluose) yra sumažinti, baigiasi augalais, turinčiais sumažintus nikotino lygius lapuose. Siūlomas išradimas pateikia būdus ir branduolio rūgšties konstrukcijas tokių transgeninių augalų gamybai, bei tokius transgeninius augalus. Tokie būdai apima antisensinę *NtQPT1* RNR ekspresiją, kuri sumažina QPRtazės kiekį tabako šaknyse. Nikotinas buvo papildomai rastas netabakinėse augalų rūšyse bei šeimose, nors esantis kiekis yra paprastai daug žemesnis nei *N. tabacum*.

Šis išradimas taip pat pateikia sensines ir antisensines rekombinantines DNR molekules, koduojančias QPRtazės arba QPRtazės antisensines RNR molekules, ir vektorius apimančius tas rekombinantines DNR molekules bei transgenines augalo

ląsteles ir augalus, transformuotus tomis DNR molekulėmis ir vektoriais. Transgeninės tabako ląstelės ir augalai šiame išradime yra charakterizuojami žemesniu arba aukštesniu nikotino kiekiu negu netransformuotos kontrolinės tabako ląstelės ir augalai.

Tabako augalai su ypatingai žemais nikotino gamybos lygiais arba be jokios nikotino gamybos yra patrauklūs kaip transgenų recipientai, išreiškiantys komerciškai vertingus produktus, tokius, kaip medikamentai, kosmetikos komponentai arba maisto priedai. Tabakas yra patrauklus kaip recipientinis augalas transgenui, koduojančiam norimą produktą, kadangi tabakas yra lengvai genetiškai konstruojamas ir gamina labai didelę biomasę į akrą: tabako augalai su sumažintais resursais, skirtais nikotino gamybai, atitinkamai turės daugiau resursų galimų transgeninių produktų gamybai. Būdai transformuoti tabaką transgenais, gaminant reikiamus produktus, yra žinomi technikos lygiu: šio išradimo tabako augalams, turintiems žemą nikotino lygį, gali būti panaudota bet kuri tinkama technika.

Tabako augalai pagal šį išradimą su sumažinta QPRtazės ekspresija ir sumažintais nikotino lygiais bus pageidaujami tabako produktų, turinčių sumažintą nikotino kiekį, gamyboje. Tabako augalai pagal šį išradimą bus tinkami naudojimui bet kuriame tradiciniame tabako produkte, apimant, bet ne apsiribojant, pypkęs, cigaro ir cigaretės tabaką, ir kramtomą tabaką, ir gali bet kuria forma apimti lapų tabaką, plėšytą tabaką arba smulkintą tabaką.

Šio išradimo konstrukcijos gali taip pat būti naudingos gaminant transgeninius augalus, turinčius padidintą QPRtazės ekspresiją ir padidintą nikotino kiekį augale. Tokios konstrukcijos, būdai, naudojant šias konstrukcijas, ir taip pagaminti augalai gali būti pageidaujami tabako produktų, turinčių pakeistą nikotino kiekį, gamyboje arba augalų, turinčių padidintą nikotino kiekį, gamyboje dėl jo insekticidinių savybių.

Esami išradėjai atrado, kad *TobRD2* genas (žiūrėti Conkling ir kt., *Plant Phys.* 93. 1203 (1990)) koduoja *Nicotiana tabacum* QPRtazę, ir duoda čia *NtQPT1* seką cDNR (anksčiau vadintą TobRD2) ir koduojamo fermento aminorūgšties seką. *NtQPT1* aminorūgšties sekos palyginimai su GenBank duomenų baze atskleidžia ribotą sekos panašumą į bakterijų proteinus, kurie koduoja fosforibozilo chinolato transferazę (QPRtazę). (**Figūra 3**).

Fosforibozilo chinolato transferazė yra reikalinga *de novo* nikotino adenino dinukleotido (NAD) biosintezei ir prokariotuose, ir eukariotuose. Dideli lygiai QPRtazės yra aptikti tabako šaknyse, bet ne lapuose. Kad galima būtų nustatyti, kad *NtQPT1* kodavo QPRtazę, esami išradėjai panaudojo *Escherichia coli* bakterijos štamą (TH265), mutantą, kuriam trūksta fosforibozilo chinolato transferazės (*nadC*). Šis mutantas negali augti minimalioje terpėje, kurioje trūksta nikotino rūgšties. Vis dėlto, *NtQPT1* proteino ekspresija šiame bakteriniame štame suteikė *NadC*⁺ fenotipą (**Figūra 4**), patvirtinantį, kad *NtQPT1* koduoja QPRtazę.

Esami išradėjai ištyrė *Nic1* ir *Nic2* mutantų poveikį tabake, ir tabako augalų dekapitavimo poveikį. *NtQPT1* pastovios būsenos mRNR lygiams ir nikotino lygiams. (Gera žinoma, kad viršūnės dominavimo pašalinimas dekapituojant žydėjimo pradžioje pasireiškia padidėjusiais nikotino biosintezės lygiais ir pernešimu tabake ir yra standartinė tabako gamybos praktika). Jei *NtQPT1* yra iš tikrųjų įtrauktas į nikotino biosintezę, tikimasi, kad (1) *NtQPT1* mRNR lygiai bus žemesni *Nic1/Nic2* dvigubuose mutantuose ir (2) *NtQPT1* mRNR lygiai padidės po dekapitacijos. *NtQPT1* mRNR lygiai *Nic1/Nic2* dvigubuose mutantuose buvo nustatyti esantys apytiksliai 25% , palyginus su laukiniais augalais (**Figūra 5**). Toliau, po šešių valandų po dekapitacijos, *NtQPT1* mRNR lygiai tabako augaluose padidėjo aštuoneriopa. Todėl, *NtQPT1* buvo nustatytas kaip pagrindinis reguliavimo genas nikotino biosintezės kelyje.

Transgeninės augalu ląstelės ir augalai

Geno ekspresijos reguliavimas augalo ląstelės genomuose gali būti pasiektas integruojant heterogeninę DNR pagal transkripcinę kontrolę promotoriaus, kuris veikia šeimininke ir kuriame transkribuota heterogeninės DNR vija yra komplementari (papildančioji) DNR vijai, kuri yra transkribuota iš endogeninio geno, kurį reikia reguliuoti. Introdukuota DNR, vadinama antisensine DNR, duoda RNR seką, kuri yra komplementari (papildančioji) natūraliai gaminamoms (endogeninėms) mRNR ir kuri slopina endogeninės mRNR ekspresiją. Toks geno ekspresijos antisensinio reguliavimo mechanizmas nėra visiškai supastas. Kol nepageidaujama laikytis jokios vieningos teorijos, yra pastebėta, kad viena antisensinio reguliavimo teorija teigia, kad antisensinės DNR transkripcija gamina RNR molekules, kurios susijungia ir sutrukdo arba slopina endogeninių mRNR molekulių transkripciją.

Šio išradimo būduose antisensinis produktas gali būti komplementarus koduojančioms arba nekoduojančioms (arba abejoms) dalims natūraliai išplitusios taikinio RNR. Antisensinė konstrukcija gali būti įvesta į augalo ląstelę bet kuriuo tinkamu būdu ir gali būti integruota į augalo genomą indukuotai arba struktūrinei antisensinės sekos transkripcijai. *Žiūr., pvz., JAV patentus Nr. 5.453.566 ir 5.107.065 Shewmaker ir kt. (įtraukti remiantis jų bendra visuma).*

Kaip čia panaudota, egzogeninė ar heterologinė DNR (arba RNR) liečia tik DNR (arba RNR), kuri buvo įvesta į ląstelę (arba ląstelės prototipą) žmonių pastangomis. Tokia heterologinė DNR gali būti kopija sekos, kuri yra natūraliai surasta transformuojamoje ląstelėje, arba jos fragmentai.

Tabako augalo, turinčio sumažintus QPRtazės lygius, ir tokiu būdu žemesnį nikotino kiekį, nei netransformuotas kontrolinis tabako augalas, gamybai tabako ląstelė gali būti transformuota egzogeniniu QPRT antisensiniu perrašymo vienetu, turinčiu dalinę QPRT cDNR seką, pilną QPRT cDNR seką, dalinę QPRT chromosominę seką arba pilną QPRT chromosominę seką; antisensinėje orientacijoje su atitinkamomis išvien veikiančiomis reguliavimo sekomis. Atitinkamos reguliavimo sekos apima transkripcijos iniciacijos seką ("promotorių"), veikiančią keičiamame augale ir poliadenilinio / transkripcijos nutraukimo seką. Yra panaudojamos standartinės technikos, tokios kaip apribojimo pažymėjimas, Southern blot hibridizacija ir nukleotido sekos analizė, kad galima būtų nustatyti tapatybę klonų, turinčių QPRtazės sekas antisensinėje orientacijoje, veikiančiomis išvien su reguliavimo sekomis. Tada tabako augalai yra regeneruojami iš sėkmingai transformuotų ląstelių. Labiausiai pageidaujama, kad naudojama antisensinė seka būtų komplementari (papildančioji) endogeninei sekai, vis dėlto, gali būti toleruojamos nedidelės variacijos egzogeninėse ir endogeninėse sekose. Pageidaujama, kad antisensinė DNR seka būtų iš pakankamai panašios sekos, kurią galima būtų sujungti su endogenine seka ląstelėje, kuri bus reguliuojama, esant griežtoms sąlygoms, kaip aprašyta žemiau.

Antisensinė technologija buvo naudojama keliose laboratorijose, kad galima būtų pagaminti transgeninius augalus, charakterizuojamus žemesniais nei normalūs specialių fermentų lygiais. Pavyzdžiui, augalai su sumažintais chalkono sintazės lygiais, gėlių pigmento biosintezės fermentai, buvo gaminami įterpiant chalkono sintazės geną į tabako ir petunijos genomą. Šie transgeniniai tabako ir petunijos augalai gamina gėles (žiedus) su šviesesniu nei normalus atspalviu (Van der Krol ir kt., "An Anti-sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", *Nature*, , 333, P. 866-69 (1988)). Antisensinė RNR technologija taip pat buvo sėkmingai panaudota poligalakturonazės fermento gamybos slopinimui pomidoruose (Smith ir kt., "Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes", *Nature*, 334, P.

724-26 (1988); Sheehy ir kt., "Reduction of Polygalacturonase Activity in Tomato Fruit by Antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. JAV*, 85. P. 8802-09 (1988)), ir mažo subvieneto ribuliozės bisfosfato karboksilazės fermento tabake (Rodermeil ir kt., "Nuclear- Organelle Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants ", *Cell*, 55. P. 673-81 (1988)). Pasirinktinai, transgeniniai augalai, charakterizuojami didesniais nei normaliai duotojo fermento kiekiais, gali būti sukurti transformuojant augalus genu šiam fermentui sensinėje (t.y., normalioje) orientacijoje. Šio išradimo nikotino lygiai transgeniniuose tabako augaluose gali būti aptikti standartiniais nikotino bandymais. Transformuoti augalai, kuriuose QPRtazės lygis yra sumažintas, palyginus su netransformuotais kontroliniais augalais, atitinkamai turės sumažintą nikotino lygį palyginus su kontroliniais: transformuoti augalai, kuriuose QPRtazės lygis yra padidintas palyginus su netransformuotais kontroliniais augalais, atitinkamai turės padidintą nikotino lygį palyginus su kontroliniais.

Heterologinė seka, naudojama šio išradimo antisensiniuose būduose, gali būti parinkta taip, kad RNR produktas būtų gaminamas kaip komplementarus (papildantysis) visai QPRtazės mRNR sekai arba jos daliai. Seka gali būti komplementari (papildančioji) bet kuriai artimai natūralios informacinės RNR sekai, t.y., ji gali būti papildančioji endogeninės mRNR sekai proksimaliai 5'-galiniam arba kepingo ("capping") saitui, pasroviui nuo kepingo saito, tarp kepingo saito ir inicijuojančio kodono ir gali padengti visą arba dalį nekoduojančio regiono, gali jungti nekoduojantį ir koduojantį regioną, būti komplementari (papildančioji) viso arba dalies koduojančio regiono atžvilgiu, komplementari (papildančioji) 3'-galiniam koduojančiam regionui arba komplementari (papildančioji) 3'-netransliuotam mRNR regionui. Tinkamos antisensinės sekos gali būti mažiausiai iš 13 iki 15 nukleotidų, mažiausiai iš 16 iki 21 nukleotidų, mažiausiai apie 20 nukleotidų, mažiausiai apie 30 nukleotidų, mažiausiai apie 50 nukleotidų, mažiausiai apie 70 nukleotidų, mažiausiai apie 100 nukleotidų.

mažiausiai apie 125 nukleotidus, mažiausiai apie 150 nukleotidų, mažiausiai apie 200 nukleotidų arba daugiau. Papildomai, sekos gali būti išplėstos arba sutrumpintos 3' arba 5' galuose.

Konkreči antisensinė seka ir antisensinės sekos ilgis keisis priklausomai nuo norimo apribojimo laipsnio, antisensinės sekos stabilumo, ir panašiai. Vienas iš srities sugebėjimų bus parinkimas atitinkamų QPRtazės antisensinių sekų, naudojant metodus, žinomus šioje srityje, ir žemiau pateiktą informaciją. Remiantis čia pateikta **Figūra 2A** ir seka **SEQ ID NO:1** išradimo oligonukleotidas gali būti QPRtazės cDNR sekos vientisas fragmentas antisensinėje orientacijoje, bet kurio ilgio, pakankamo gauti norimus efektus transformuojant į gavėjo augalo ląstelę.

Šis išradimas taip pat gali būti naudojamas nikotino gamybos sensinio bendranuslopavimo būduose. Sensinių DNR'ų, naudojamų atlikti šį išradimą, ilgis yra toks, kuris, kai ekspresuojama augalo ląstelėje, yra pakankamas nuslopinti įgimtą augalo QPRtazės proteino ekspresiją šioje augalo ląstelėje, kaip čia aprašyta. Tokios sensinės DNR gali būti iš esmės visa genominė arba komplementari (papildančioji) DNR, koduojanti QPRtazės fermentą, arba jos fragmentas, kai tokio fragmento ilgis yra tipiškai mažiausiai 15 nukleotidų. Sensinės DNR, kuri slopina įgimto geno ekspresiją ląstelėje, ilgio nustatymo metodai yra žinomi šios srities specialistams.

Alternatyviame šio išradimo įgyvendinime, *Nicotiana* augalo ląstelės yra transformuojamos DNR konstrukcija, turinčia DNR segmentą, koduojantį fermento RNR molekulę (t.y., "ribozimą"), kai ši fermento RNR molekulė yra nukreipiama prieš (t.y., skaldo) mRNR DNR transkriptą, koduojantį augalo QPRtazę kaip aprašyta čia. Ribozimai apima substrato prijungimo domenų, kurie prisijungia prie pasiekiamų taikinio mRNR regionų, ir domenų, kurie katalizuoja RNR skaldymą, užkirsdami kelią baltymo sintezei. Prijungimo domenai gali turėti

antisensines sekas, papildomas taikinio mRNR sekai; katalitinis fragmentas gali būti "plaktuko" tipo arba kitoks fragmentas, toks, kaip "segtuko" tipo. Ribozimo skaldymo taškai taikinio RNR gali iš pradžių būti identifikuoti skenuojant taikinio molekulę ribozimo skaldymo saitų atžvilgiu (pvz., GUA, GUU, arba GUC sekos). Vieną kartą identifikuotos, trumpos RNR sekos iš 15, 20, 30 ar daugiau ribonukleotidų, atitinkančių taikinio geno regionui, turinčiam skaldymo saitus, gali būti įvertintos pagal prognozuojamas struktūrines savybes. Galimų taikinių tinkamumas taip pat gali būti įvertintas bandant jų galimumą hibridizuotis su papildančiais oligonukleotidais, naudojant ribonukleazės apsaugos bandymus, žinomus šiame dalyke. DNR, koduojanti fermento RNR molekules, gali būti pagaminta pagal žinomas technologijas. *Žiūrėti, pav., T. Cech ir kt., JAV patentas Nr. 4,987,071; Keene ir kt., JAV patentas Nr. 5,559,021; Donson ir kt., JAV patentas Nr. 5,589,367; Torrence ir kt., JAV patentas Nr. 5,583,032; Joyce, JAV patentas Nr. 5,580,967; Gold ir kt. JAV patentas No. 5,595,877; Wagner ir kt., JAV patentas No. 5,591,601; ir US patentas Nr. 5,622,854 (pateikti atskleidimai, atsižvelgiant į jų visumą).* Tokios fermento RNR molekulės gamyba augalo ląstelėje ir QPRtazės proteino gamybos nutraukimas sumažina QPRtazės veikimą augalo ląstelėse iš esmės tokiu pačiu būdu, kaip ir antisensinės RNR molekulės gamyba: t.y., nutraukiant mRNR baltymų sintezę ląstelėje, gaminančioje fermentą. Terminas "ribozimas" yra naudojamas čia aprašymui RNR turinčios nukleino rūgšties, kuri veikia kaip fermentas (toks, kaip endoribonukleazė), ir gali būti naudojama pakaitomis su "fermento RNR molekule". Šis išradimas toliau apima DNR, koduojančią ribozimus, DNR koduojančią ribozimus, kurie buvo įterpti į ekspresijos vektorių, šeimininko ląsteles, turinčias tokius vektorius ir QPRtazės gamybos sumažinimo būdus augaluose, naudojant ribozimus.

Nukleino rūgšties sekos, naudojamos vykdant šį išradimą, apima tas, kurios panašios į seką **SEQ ID NO:1**, ir koduoja proteiną, turintį fosforibozilo chinolato transferazės veikimą. Šis apibrėžimas yra skirtas apimti natūralias alelines variacijas QPRtazės proteinuose. Tokiu būdu, DNR sekos, kurios hibridizuojasi į

SEQ ID NO:1 DNR ir koduojasi QPRtazės ekspresijai, ypač augalo QPRtazės fermentai, gali taip pat būti panaudotos vykdant šį išradimą.

Gali egzistuoti įvairiarūšės tabako QPRT fermento formos. Įvairiarūšės formos fermento gali būti dėl pobaltyminės sintezės modifikacijos atskiro geno produkto, arba dėl įvairiarūšių *NtQPT1* geno formų.

Sąlygos, kurios leidžia kitoms DNR sekoms, kurios koduoja proteino, turinčio QPRtazės aktyvumą, ekspresiją hibridizuotis su seka **SEQ ID NO:1** DNR arba kitomis DNR sekomis, koduojančiomis proteiną, parodytą kaip seka **SEQ ID NO:2**, gali būti apibrėžtos kaip įprastinės. Pavyzdžiui, tokių sekų hibridizacija gali būti atlikta esant sumažinto griežtumo sąlygoms arba net griežtoms sąlygoms (pavyzdžiui, sąlygoms, būdingoms perplaunant DNR, koduojančią proteiną, parodytą čia kaip seką **SEQ ID NO:2**, 0,3 M NaCl, 0,03 M sodos citrato, 0,1% SDS esant 60⁰C arba net 70⁰C standartiniame *in situ* hibridizacijos bandyme. Žiūrėti J. Sambrook ir kt., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)). Paprastai, tokios sekos bus bent 65% panašios, 75% panašios, 80% panašios, 85% panašios, 90% panašios, arba net 95% panašios, arba daugiau, su seka, duota čia kaip seka **SEQ ID NO:1**, arba DNR sekomis, koduojančiomis proteinus, turinčius seką **SEQ ID NO:2**. (sekų panašumo apibrėžimai yra padaryti su dvejomis sekomis, pritaikytomis maksimaliam priderinimui; spragos bet kurioje iš šių dvejų sekų yra leidžiamos maksimizuojant priderinimą. Spragų ilgiai iš 10 arba mažiau yra pageidaujami, spragų ilgiai iš 5 arba mažiau yra labiau pageidaujami, ir spragų ilgiai iš 2 arba mažiau vis dar yra labiau pageidaujami).

Yra galimos diferencinės hibridizacijos procedūros, kurios leidžia izoliuoti cDNR klonus, kurių mRNR lygiai žemesni nei 0.05% poli(A⁺)RNR. Žiūrėti M. Cokling ir kt., *Plant Physiol.* 93, 1203-1211 (1990). Trumpai, cDNR bibliotekos yra atrinktos naudojant vienos vijos cDNR bandinius atvirkščiai transkribuotos mRNR

iš augalo audinio (pavyzdžiui, šaknų ir / arba lapų). Diferenciniam atrinkimui, nitroceliuliozės arba nailono membrana yra išmirkyta $5\times\text{SSC}$, esančiame 96 šulinėlių siurbimo kolektoriuje, $150\mu\text{L}$ laikytos per naktį kultūros pernešta nuo pagrindinės plokštelės į kiekvieną šulinėlį, ir buvo siurbama iki kol skystis praėjo pro filtrą. $150\mu\text{L}$ denatūravimo skysčio (0.5M NaOH , 1.5M NaCl) buvo patalpinta į kiekvieną šulinėlį, naudojant daugiafunkcinę pipetę ir laikoma apie 3 minutes. Taikytas siurbimas kaip anksčiau ir filtras pašalintas ir neutralizuotas 0.5M Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$), 0.5M NaCl . Tada jis buvo džiovinamas 2 valandas *in vacuo* ir inkubuojamas su atitinkamais bandiniais. Naudojant nailono membranos filtrus ir saugant pagrindines plokšteles 7% DMSO prie -70°C , filtrai gali būti naudojami daug kartų su įvairiarūšiais bandiniais ir atitinkami klonai, atgaminami po keleto laikymo metų.

Kaip čia panaudota, terminas 'genas' reiškia DNR seką, kuri apima (1) kryptinį prieš srovę (5') einančius reguliavimo signalus, turinčius promotorių, (2) kodavimo regioną, kuris apibūdina produktą, proteiną arba geno RNR, (3) kryptimi pasroviui (3') einančius regionus, turinčius transkripcijos nutraukimo ir poliadenilimo signalus ir (4) susijusias sekas, reikalingas veiksmingai ir specifinei ekspresijai.

Šio išradimo DNR seka gali iš esmės susidėti iš čia pateiktos (SEQ ID NO:1) sekos, arba iš ekvivalenčių nukleotidinių sekų, atspindinčių šių genų alelinius arba polimorfinius variantus, arba juos koduojančius regionus.

Frazės "realus sekos panašumas" naudojimas šiame aprašyme ir apibrėžtyje reiškia, kad DNR, RNR arba aminorūgšties sekos, kurios turi nežymias ir neturinčias pasekmių sekos variacijas iš dabartinių sekų, atskleistų ir apibrėžtų čia, yra laikomos ekvivalenčiomis šio išradimo sekoms. Dėl to, "nežymios ir neturinčios pasekmių sekos variacijos" reiškia, kad "panašios" sekos (t.y., sekos, kurios turi realų sekų panašumą su DNR, RNR arba proteinais, atskleistais ir

apibrėžtais čia) bus funkciškai ekvivalenčios sekoms, atskleistoms ir apibrėžtoms šiame išradime. Funkciškai ekvivalenčios sekos veiks realiai tokiu pačiu būdu, realiai gamindamos tokias pat kompozicijas, kaip nukleino rūgšties arba amino-rūgšties kompozicijos, atskleistos ir aprašytos čia.

DNR sekos, pateiktos čia, gali būti transformuotos į įvairiarūšes šeimininko ląsteles. Dauguma tinkamų šeimininko ląstelių, turinčių reikiamas augimo ir priežiūros savybes, yra lengvai įmanomos šioje srityje.

Frazės "izoliuotas" arba "realiai grynas" naudojimas šiame aprašyme ir apibrėžtyje kaip DNR, RNR, polipeptidų arba proteinų modifikatoriaus reiškia, kad taip nurodyti DNR, RNR, polipeptidai, proteinai buvo atskirti nuo jų *in vivo* ląstelinės aplinkos žmonių pastangoms.

Kaip čia panaudota, "įgimta DNR seka" arba "natūrali DNR seka" reiškia DNR seką, kuri gali būti izoliuota nuo netransgeninių ląstelių arba audinio. Įgimtos DNR sekos yra tos, kurios nebuvo dirbtinai pakeistos, taip, kaip į saitus nukreipta mutagenezė. Kai įgimtos DNR sekos yra nustatytos, DNR molekulės, turinčios įgimtas DNR sekas, gali būti chemiškai sintezuojamos arba gaminamos naudojant rekombinantines DNR procedūras, kaip yra žinoma šioje srityje. Kaip čia panaudota, įgimta augalo DNR seka yra ta, kuri gali būti izoliuota nuo netransgeninių augalo ląstelių arba audinio. Kaip čia panaudota, įgimta tabako DNR seka yra ta, kuri gali būti izoliuota nuo netransgeninių tabako ląstelių arba audinio.

DNR konstrukcijos arba "transkripcijos kasetės" šiame išradime apima kryptimi nuo 5' iki 3' transkripcijos promotorių, kaip čia aptarta, DNR seką, operatyviai susijusią su promotoriumi, kaip čia aptarta, ir, pasirinktinai, nutraukimo seką, apimančią stop signalą RNR polimerazei ir poliadenilinimo signalą poliadenilazei. Visi šie reguliavimo regionai turėtų būti valdomi audinio, kuris bus

transformuojamas, ląstelėse. Bet koks tinkamas nutraukimo signalas gali būti panaudotas vykdant šį išradimą, kurio pavyzdžiai apima, bet ne apriboja. nopalino sintazės (*nos*) terminatorių, oktapino sintazės (*ocs*) terminatorių, CaMV terminatorių arba įgimto terminavimo signalus, kilusius iš to paties geno kaip ir transkripcinis iniciacijos regionas arba kilusius iš skirtingų genų. Žiūrėti, pvz., Rezian ir kt. (1988), kaip ankščiau (tekste) ir Rodermel ir kt. (1988), kaip ankščiau (tekste).

Terminas "operatyviai susijęs", kaip čia panaudota, remiasi DNR sekomis vienoje DNR molekulėje, kurios yra susijusios taip, kad vienos funkcija yra veikiamą kitos. Tokiu būdu, promotorius yra operatyviai susijęs su DNR, kai juo galima paveikti šios DNR transkripciją (t.y., DNR yra transkriptiškai kontroliuojama promotoriaus). Promotorius yra laikomas esantis kryptimi "prieš srovę" nuo DNR, kuri, tuo pačiu, yra kryptimi "pasroviui" nuo promotoriaus.

Transkripcijos kasetė gali būti įterpta į DNR konstrukciją, kuri taip pat turi mažiausiai vieną replikacijos sistemą. Patogumui yra įprasta turėti replikacinę sistemą, veikiančią *Escherichia coli*, tokioje, kaip ColE1, pSC101, pACYC184, arba panašiai. Tokiu būdu, kiekvienoje pakopoje po kiekvienos manipuliacijos konstrukcija gali būti klonuota, nustatyta jos seka ir nustatytas manipuliacijos teisingumas. Papildomai, arba vietoje *E. coli* replikacijos sistemos, gali būti panaudota didelio skaičiaus šeimininkų replikacijos sistema, tokia, kaip P-1 nesuderinamumo plazmidžių replikacijos sistemos, pavyzdžiui pRK290. Be replikacijos sistemos, dažnai bus mažiausiai vienas markeris, kuris gali būti naudingas viename ar daugiau šeimininkų, arba skirtingi markeriai individualiems šeimininkams. Tai yra, vienas markeris gali būti panaudotas pasirinktinai prokariotiniame šeimininke, kai tuo tarpu kitas markeris gali būti panaudotas pasirinktinai eukariotiniame šeimininke, ypač augalo šeimininke. Markeriai gali būti apsauga nuo biocido, tokio, kaip antibiotikai, toksinai, sunkieji metalai arba

panašiai; gali suteikti papildymą perteikiant prototrofiją auksotrofiniam šeimininkui; arba gali suteikti matomą fenotipą gaminant augale naują junginį.

[vairūs fragmentai, turintys įvairias konstrukcijas, transkripcijos kasetes, markerius, ir panašiai, gali būti įvesti nuosekliai skaidant restrikcijos fermentais atitinkamas replikacijos sistemas, ir įterpiant konkrečią konstrukciją arba fragmentą į esamą saitą. Po ligavimo ir klonavimo DNR konstrukcija gali būti izoliuota tolimesnei manipuliacijai. Visi šie metodai yra plačiai pateikti pavyzdžiais literatūroje, pavyzdžiu J. Sambrook ir kt., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Manual (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory).

Vektoriai, kurie gali būti panaudoti transformuojant augalo audinį nukleino rūgšties konstrukcija, šiame išradime apima tiek *Agrobacterium* vektorius, tiek balistinius vektorius, taip pat vektorius, tinkamus DNR-medijuojamai transformacijai.

Terminas 'promotorius' remiasi regionu DNR sekos, kuri apima reikalingus signalus efektyviai koduojančios sekos ekspresijai. Tai gali apimti sekas, prie kurių prisiriša RNR polimerazė, bet neapsiribojama tokiomis sekomis, ir gali apimti regionus, prie kurių prisiriša kiti reguliaciniai proteinais kartu su regionais, įtrauktais į proteino baltymo sintezės kontrolę, ir gali apimti koduojančias sekas.

Promotoriai, naudojami vykdyti šį išradimą, gali būti struktūriškai aktyvūs promotoriai. Yra daug struktūriškai aktyvių promotorių, kurie veikia augaluose. Pageidautinas pavyzdys yra žiedinio kopūsto mozaikinio viruso (CaMV) 35S promotorius, kuris yra struktūriškai išreikštas daugelyje augalo audinių. Alternatyviai, promotorius gali būti specialus šaknies promotorius arba specialus šaknies žievės promotorius, kaip detalčiau paaiškinta žemiau.

Antisensinės sekos buvo išreikštos transgeniniuose tabako augaluose, naudojant žiedinio kopūsto mozaikinio viruso (CaMV) 35S promotorių. Žiūrėti, pvz., Cornelissen ir kt., "Both RNA Level and Translation Efficiency are Reduced by Anti-Sense RNA in Transgenic Tobacco", *Nucleic Acid Res.* 17, P. 833-43 (1989); Rezaian ir kt., "Anti-Sense RNAs of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Plants Assessed for Control of the Virus", *Plant Molecular Biology* 11, P. 463-71 (1988); Redermel ir kt., "Nuclear-Organelle Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants", *Cell* 55, P. 673-81 (1988); Smith ir kt., "Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes", *Nature* 334, P. 724-26 (1988); Van der Krol ir kt., "Anti-Sense Chalcone in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", *Nature* 333, P. 866-69 (1988).

CaMV 35S promotoriaus naudojimas QPRtazės ekspresijai transformuotose tabako ląstelėse ir augaluose šiame išradime yra pageidautinas. CaMV promotoriaus naudojimas kitų rekombinantinių genų ekspresijai tabako šaknyse buvo aprašytas (Lam ir kt., "Site-Specific Mutations Alter In Vitro Factor Binding and Change Promoter Expression Pattern in Transgenic Plants", *Proc. Nat. Acad. Sci. JAV* 86, P. 7890-94 (1989); Poulsen ir kt., "Dissection of 5' Upstream Sequences for Selective Expression of the *Nicotiana plumbaginifolia* rbc-8B Gene", *Mol. Gen. Genet.* 241, P. 16-23 (1988)).

Kiti promotoriai, kurie yra aktyvūs tik šaknų audiniuose (specifiniai šaknų promotoriai), yra taip pat ypač tinkantys šio išradimo būdams. Žiūrėti, pvz., JAV patentą Nr. 5.459.252 Conkling ir kt.; Yamamoto ir kt., *The Plant Cell*, 3:371 (1991). Taip pat gali būti panaudotas specifinis TobRD2 šaknies žievės promotorius Žiūrėti, pvz., dabar paduotą JAV patentinę paraišką SN 08/508.786. Conkling ir kt.: PCT WO 9705261. Visi čia cituoti patentai yra laikomi atskleistais remiantis jų bendra visuma.

QPRtazės rekombinantinės molekulės ir vektoriai, naudojami gaminti transformuotas tabako ląsteles ir augalus šiame išradime gali toliau apimti dominuojantį selekcinį markerinį geną. Tinkami naudojimui tabake dominuojantys selekciniai markeriai apima, tarp kitko, antibiotikams atsparius genus, koduojančius neomicino fosfotransferazę (NPTII), hidromicino fosfotransferazę (HPT), ir chloramfenikolo acetiltransferazę (CAT). Kitas gerai žinomas dominuojantis selekcinis markeris tinkamas naudojimui tabake, yra mutantinis dihidrofoliato reduktazės genas, kuris koduoja atsparią metotreksatui dihidrofoliato reduktazę. DNR vektoriai, turintys tinkamus antibiotikams atsparius genus, ir atitinkami antibiotikai yra komerciškai prieinami.

Transformuotos tabako ląstelės yra parinktos iš netransformuotų aplinkos populiacijos ląstelių, patalpinant įvairiarūšę ląstelių populiaciją į kultūros terpę, turinčią atitinkamą antibiotiko koncentraciją (arba kito mišinio normaliai toksiško tabako ląstelėms), kurioms atitinkamas geno produkto dominuojantis selekcinis markeris suteikė atsparumą. Tokiu būdu, tik tos tabako ląstelės, kurios buvo transformuotos, išgyvens ir dauginsis.

Rekombinantinių augalų gamybos būdai šiame išradime, apskritai, pirmiausia apima augalo ląstelę, galinčią regeneruoti (augalo ląstelę, kuri tipiškai reiškiasi regeneruoti galinčiame augale). Augalo ląstelė yra tada transformuojama DNR konstrukcija, apimančia šio išradimo transkripcijos kasetę (kaip čia aprašyta) ir rekombinantinis augalas yra regeneruojamas iš transformuotos augalo ląstelės. Kaip paaiškinta žemiau, transformacijos pakopa yra įvykdyta būdais, žinomais šioje srityje, apimant, bet ne ribojant, augalo ląstelės bombardavimą mikrodalelėmis, turinčiomis transkripcijos kasetę, ląstelės infekavimą *Agrobacterium tumefaciens*, apimančiais Ti plazmidę, pernešančią transkripcijos kasetę, arba daugiau kitų metodų, tinkamų transgeninio augalo gamybai.

Yra žinoma daug *Agrobacterium* vektorių sistemų, tinkamų vykdant šį išradimą. Pavyzdžiui, JAV patentas Nr. 4.459,355 atskleidžia būdą transformuoti jautrius augalus, apimant dviskilčius. *Agrobacterium* kamienų, turinčių Ti plazmidę. Sumedėjusių augalų transformacija *Agrobacterium* vektoriumi yra atskleista JAV patente Nr. 4.795,855. Toliau, JAV patentas Nr. 4,940,838 Schilperoort ir kt., atskleidžia binarinį *Agrobacterium* vektorių (t.y., tą, kuriame *Agrobacterium* turi vieną plazmidę, turinčią Ti plazmidės vir regioną, bet neturinčią T regiono, ir kitą plazmidę, turinčią T regioną, bet neturinčią vir regiono), naudingą vykdant šį išradimą.

Mikrodalelės, turinčios šio išradimo DNR konstrukciją, kai mikrodalelė yra tinkama balistinei augalo ląstelės transformacijai, yra taip pat naudingos daryti šio išradimo transformuotus augalus. Mikrodalelė yra įterpiama į augalo ląstelę, kad gaminti transformuotą augalo ląstelę, ir iš transformuotos augalo ląstelės yra regeneruojamas augalas. Bet kuri tinkama balistinės ląstelės transformacijos metodologija ir aparatas gali būti naudojamas vykdant šį išradimą. Pavyzdinis aparatas ir būdai yra atskleisti Sanford ir Wolf JAV patente Nr. 4.945.050, ir Christou ir kt., JAV patente Nr. 5.015,580. Naudojant balistinės transformacijos procedūras transkripcijos kasetė gali būti įvesta į plazmidę, galinčią pasikartoti arba integruotis į transformuojamą ląstelę. Mikrodalelių, tinkamų naudojimui tokiose sistemose, pavyzdžiai apima nuo 1 iki 5 μm auksinių sferų. DNR konstrukcija gali būti užnešta ant mikrodalelės bet kuriuo tinkamu būdu, tokiu kaip nusėdimas.

Pagal šį išradimą augalo rūšys gali būti transformuotos DNR konstrukcija, DNR-medijuojamu būdu transformuojant augalo ląstelės protoplastus, ir po to regeneruojant augalą iš transformuotų protoplastų sutinkamai su būdais, gerai žinomais šioje srityje. Tabako protoplastų susilieėjimas su DNR turinčiomis liposomomis arba elektroporacija yra žinomi šioje srityje. (Shillito ir kt., "Direct Gene Transfer to Protoplasts of Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants by

a Number of Methods Including Electroporation" *Methods in Enzymology* 153. P. 313-36 (1987)).

Kaip čia panaudota, transformacija remiasi egzogeninės DNR įvedimu į ląsteles, taip, kad galima būtų gaminti transgenines ląsteles, pastoviai transformuotas egzogenine DNR.

Transformuotos ląstelės yra įjungiamos kad regeneruotų nepažeistus tabako augalus taikant tabako ląstelės ir audinio techniką, kuri yra gerai žinoma šioje srityje. Augalo regeneracijos būdas yra pasirinktas toks, kad jį galima būtų suderinti su transformacijos būdu. Pastovus QPRtazės sekos buvimas ir orientacija transgeniniuose tabako augaluose gali būti patvirtintas QPRtazės sekos Mendelio paveldimumu, kaip nustatyta standartiniais DNR analizės metodais, pritaikytais palikuoniui, gautam iš kontolijuojamų kryžminimų. Po transgeninių tabako augalų regeneracijos iš transformuotų ląstelių, įvesta DNR seka yra lengvai pervedama į kitas tabako atmainas, taikant bendrai priimtas augalų selekcijos metodikas ir be nereikalingų eksperimentų.

Pavyzdžiui, transgeno atsiskyrimo analizei, regeneruoti transformuoti augalai (R_0) gali būti išauginami iki subrendimo, nustatomas nikotino kiekis, ir apdulkinami gaminti R_1 augalus. Dalis R_1 augalų, turinčių transgeną, yra homozigotiniai transgenai. Kad nustatyti homozigotinius R_1 augalus, transgeniniai R_1 augalai yra auginami iki subrendimo ir apdulkinami. Homozigotiniai R_1 augalai gamins R_2 palikuonius, kur kiekvienas palikuonio augalas turi transgeną; heterozigotinių R_1 augalų palikuoniai atsiskirs 3:1.

Nikotinas veikia kaip natūralus pesticidas, kuris padeda apsaugoti tabako augalus nuo kenkėjų pažeidimų. Todėl gali būti pageidaujama papildomai transformuoti turinčius mažai arba be nikotino augalus, gaminamus šiais būdais transgenu (tokiu kaip *Bacillus thuringiensis*), kuris suteiks papildomą apsaugą nuo vabzdžių.

Pageidaujamas naudojimui augalas šiuose būduose yra rūšys *Nicotiana*, arba tabakas, apimant *N. tabacum*, *N. rustica* ir *N. glutinosa*. Gali būti naudojama bet kuri tabako gentis arba atmaina. Pageidautinos yra gentys, kurios jau turi žemą nikotino turinį, tokios kaip *Nic1/Nic2* dvigubi mutantai.

Bet kuris augalo audinys, kurį galima vėliau klonuoti organogeneze arba embriogeneze gali būti transformuotas šio išradimo vektoriumi. Terminas "organogeneze", kaip čia panaudota, reiškia procesą, kuriuo pumpurai ir šaknys yra išauginami vienas po kito iš meristeminių centrų; terminas "embriogeneze", kaip čia panaudota, reiškia procesą, kuriuo pumpurai ir šaknys auga kartu suderintu būdu (ne paeiliui), arba iš somatinių ląstelių, arba iš lytinių ląstelių. Atskiras audinys keisis priklausomai nuo galimų klonavimo sistemų, ir geriausiu atveju, nuo ypatingųjų transformuojamų rūšių. Pavyzdiniai audinio taikiniai apima lapų diskus, žiedadulkes, embrionus, sėklaskiltes, hipokotilius, kaliaus audinį, egzistuojantį meristemini audinį (pavyzdžiui, viršūnines meristemas, pažastinius pumpurus ir šaknų meristemas), ir indukuotą meristemos audinį (pavyzdžiui, sėklaskiltės meristema ir hipokotilinė meristema).

Augalai šiame išradime gali turėti daug formų. Augalai gali būti transformuotų ląstelių ir netransformuotų ląstelių chimeros: augalai gali būti kloniniai transformantai (pavyzdžiui, visos ląstelės pakeistos, kad turėtų transkripcijos kasetę); augalai gali turėti transformuotų ir netransformuotų audinių skiepus (pavyzdžiui, transformuotos šaknies šeima įskiepyta į netransformuotą atžalą citruso rūšyse). Transformuoti augalai gali būti dauginami daugeliu būdų, tokių, kaip klonavimas arba klasikiniai selekcijos būdais. Pavyzdžiui, pirmos kartos (arba T1) transformuoti augalai gali būti apdulkinti kad duotų homozigotinius antros kartos (arba T2) transformuotus augalus, ir T2 augalai toliau dauginami klasikiais selekcijos būdais. Dominantinis selekcinis markeris (toks, kaip *nptII*) gali būti susietas su transkripcijos kasete, kad dalyvautų selekciijoje.

Sekant tolimesniu aprašymu, paaiškės, kad augalai, kurie gali būti panaudoti šio išradimo praktikoje apima tuos genus, kurie yra iš genų *Nicotiana*.

Pripažinti anksčiau žinomi būdai su rekombinantine DNR molekule aprašo, kad vienas iš jų gali naudoti pilną QPRtazės cDNR molekulę arba pilną QPRtazės chromosominį geną, pridėtą sensinėje orientacijoje, veikiantį išvien su reguliacinėmis sekomis, kad suformuotų transgenines tabako ląsteles ir augalus. (Tie, kurie nusimano šioje srityje, taip pat pastebės, kad atitinkamos reguliacinės sekos genų ekspresijai sensinėje orientacijoje apima bet kurias iš žinomų eukariotinės baltymų sintezės paleidimo sekas, be to, promotoriaus ir poliadenilavimo/transkripcijos nutraukimo sekas, aprašytas anksčiau). Tokie transformuoti tabako augalai yra apibūdinami padidėjusiais QPRtazės lygiais ir tuo pačiu aukštesniu nikotino kiekiu, nei netransformuoti kontroliniai tabako augalai.

Todėl turėtų būti suprasta, kad QPRtazės DNR sekų naudojimas QPRT fermento lygių sumažinimui arba padidinimui, ir tuo būdu nikotino turinio sumažinimui arba padidinimui tabako augaluose, patenka į šio išradimo akiratį.

Kaip čia panaudota, derlius apima daugumą šio išradimo augalų ir tuo pačiu genų, pasėtų kartu agrokultūriniame plote. Sakant "agrokultūrinis plotas", turima galvoje bendrasis dirvožemio arba šiltnamio plotas. Tokiu būdu, šis išradimas pateikia būdą gaminti derlių augalų, turinčių pakeistą QPRtazės veikimą ir tokiu būdu turinčių padidintus arba sumažintus nikotino lygius, palyginus su panašiu tos pačios rūšies ir daugumos netransformuotų augalų derliumi.

Pateikti pavyzdžiai iliustruoja šį išradimą, bet ir nėra traktuojami kaip ribojantys anksčiau aprašytus dalykus.

1 PAVYZDYS

Išskyrimas ir sekos nustatymas

TobRD2 cDNR (Conkling ir kt., *Plant Phys.* 93, 1203 (1990)) seka nustatyta ir yra pateikiama čia kaip seka **SEQ ID NO:1** ir išvestinė aminorūgščių seka kaip seka **SEQ ID NO:2**. Išvestinė aminorūgščių seka buvo numatyta esanti citozolinis proteinas. Nors ir QPRtazės genai nebuvo aprašyti, *NtPTI* aminorūgščių sekos palyginimai su GenBank duomenų baze (**Figūra 3**) atskleidė ribotą sekos panašumą su tam tikrais bakteriniais ir kitais proteinais: fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazė) aktyvumas buvo pademonstruotas su *S. typhimurium*, *E. coli* ir *N. tabacum* genais. *NtQPTI* koduota QPRtazė turi panašumą su išvestu peptido fragmentu, koduotu *Arabidopsis* EST (ekspresijos sekos žymė) sekos (Genbank priėjimo kodas F20096), kuri gali atspindėti dalį *Arabidopsis* QPRtazės geno.

2 PAVYZDYS

In-Situ hibridizacijos

TobRD2 mRNR transkriptų erdvinio paskirstymo nustatymui įvairiuose šaknies audiniuose, buvo atliktos *in situ* hibridizacijos netransformuotuose augaluose. *TobRD2* į *TobRD2* mRNR antisensinės vijos *in situ* hibridizacijos šaknies audinyje buvo atliktos naudojant būdus, kaip aprašyta Meyerowitz, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5.242 (1987) ir Smith ir kt., *Plant Mol. Biol. Rep.* 5.237 (1987). Septynių dienų tabako (*Nicotiana tabacum*) daigo šaknys buvo fiksuojamos fosfato gliutaraldehido buferiu, įkastos į Paraplast Plus (Monoject Inc., St. Louis, MO) ir supjaustytos 8 mm storiu, kad gauti skersinius, taip pat ir išilginius pjūvius. Antisensiniai *TobRD2* transkriptai, sintezuoti *in vitro* esant 35S-ATP, buvo naudojami kaip zondai. Pažymėta RNR buvo hidrolizuota veikiant šarmu kad galima būtų gauti išeigą nuo 100 iki 200 pagrindinės masės vidurkio intervalo buvusio prieš naudojimą.

Hibridizacijos truko 16 valandų 50% formamide prie 42⁰C su maždaug 5×10^6 impulsų-per-minutę (cpm) pažymėta RNR vienam mililitrui hibridizacijos tirpalo. Po išlaikymo, slaidai buvo išryškinti ir vizualizuoti šviesaus ir tamsaus fono mikroskopija.

Hibridizacijos signalas buvo lokalizuotas žievės ląstelių sluoksnyje šaknyse (rezultatai neparodyti). Abiejų, šviesaus ir tamsaus fono laukų palyginimas parodė, kad tų pačių pjūvių TobRD2 transkriptai lokalizuoti parenchiminėse šaknies žievės ląstelėse. Nebuvo matyti jokio hibridizacijos signalo epidermyje arba stelėje.

3 PAVYZDYS

TobRD2 mRNR lygiai *Nic1* ir *Nic2* tabako mutantuose ir koreliacija su nikotino lygiais

TobRD2 pastovios būsenos mRNR lygiai buvo ištirti *Nic1* ir *Nic2* mutantiniuose tabako augaluose. *Nic1* ir *Nic2* yra žinomi, kaip galintys reguliuoti fosforibozilo chinolato transferazės veikimą ir putrescino metil-transferazės veiklą, ir yra bendradominantiniai nikotino gamybos reguliatoriai. Šie rezultatai yra iliustruoti **Figūrose 5A ir 5B** ir parodo, kad *TobRD2* ekspresija yra reguliuojama *Nic1* ir *Nic2*.

RNR buvo izoliuotas nuo laukinio tipo Burley 21 tabako augalų šaknų (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*); *Nic1*- Burley 21 šaknų (*nic1/nic1 Nic2/Nic2*); *Nic2*- Burley 21 šaknų (*Nic1/Nic1 nic2/nic2*); ir *Nic1*- *Nic2*- Burley 21 šaknų (*nic1/nic1 nic2/nic2*).

Keturios Burley 21 tabako linijos (nic) buvo auginamos iš sėklų dirvožemyje mėnesį ir perkeltos į hidroponines kameras aeruotame maistingame tirpale

šiltnamyje vienam mėnesiui. Šios linijos buvo izogeninės, išskyrus du žemo nikotino lygio lokusus, ir turėjo genotipus *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*, *Nic1/Nic1 nic2/nic2*, *nic1/nic1 Nic2/Nic2*, *nic1/nic1 nic2/nic2*. Šaknys buvo nuimtos nuo maždaug 20 augalų kiekvienam genotipui ir apjungtos RNR išskyrimui. Bendras RNR (1µg) iš kiekvienos vietos taško buvo elektroforezuotas 1% agarozės gelyje, turinčiame 1.1M formaldehido, ir perkeltas į nailono membraną, pagal Sambrook ir kt. (1989). Membranos buvo hibridizuotos su ³²P-pažymetais TobRD2 cDNR fragmentais. Santykinis TobRD2 transkriptų intensyvumas buvo išmatuotas densitometrijos būdu. **Figūra 5** (vientisos linijos) iliustruoja santykinius transkriptinius lygius (palyginus su *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*) kiekvienam iš keturių genotipų. Keturių genotipų santykinis nikotino kiekis (palyginus su *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*) yra parodytas skaidytomis linijomis.

Figūra 5 grafiškai palygina santykinį pastovios būsenos TobRD2 mRNR lygį, naudojantis lygiu, rastu laukinio tipo Burley 21 (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*), kaip standartu. *TobRD2* mRNR lygiai *Nic1/Nic2* dvigubuose mutantuose buvo maždaug 25% laukinio tipo tabako lygio. **Figūra 5B** toliau palygina santykinius nikotino lygius artimose izogeninėse linijose tabako, ištirtose šiame pavyzdyje (vientisos linijos nurodo *TobRD2* transkripto lygį; skaidytos linijos nurodo nikotino lygį). Tarp nikotino lygių ir *TobRD2* transkripto lygių buvo artima koreliacija.

4 PAVYZDYS

Dekapitacijos įtaka *TobRD2* mRNR kiekiams

Yra gerai žinoma šioje srityje, kad tabako augalo viršūnės pašalinimas (dekapitacija) padidina šaknų augimą ir padidina augalo lapų nikotino turinį. Komerciniame tabako veisime augalo dekapitacija yra standartinė praktika, ir optimalų tabako augalo dekapitacijos laiką pagal eilę žinomų auginimo sąlygų gali lengvai nustatyti eilinis tos srities specialistas.

Tabako augalai (*N. tabacum* SR1) buvo auginami iš sėklos dirvožemyje vieną mėnesį ir perkelti į katiliukus, pripildytus smėlio. Augalai buvo auginami šiltnamyje dar du mėnesius, kol pradėjo pumpuruotis. Tada nuo keturių augalų (dekapitacija) buvo nuimtos žiedų galvutės ir du bambliai. Po nurodyto laiko nuo kiekvieno augalo buvo nuimta dalis šaknų ir sujungta RNR ekstrakcijai. Kontroliniai augalai nebuvo dekapituoti. Bendras RNR (1µg) iš kiekvienos vietos taško buvo elektroforezuotas 1% agarozės gelyje, turinčiame 1.1M formadelhido, ir perkeltas į nailono membraną pagal Sambrook, ir kt. (1989). Membranos buvo hibridizuotos ³²P-pažymėtais *TobRD2* cDNR fragmentais. *TobRD2* transkriptų santykinis intensyvumas buvo išmatuotas densitometrija. **Figūra 6** iliustruoja santykinius transkripto lygius (palyginus su nuliniu laiku) kiekvienam laiko taškui su dekapitacija (vientisos linijos) arba be dekapitacijos (skaidytos linijos).

Šaknų audinyje per 24 valandas buvo nustatyti santykiniai *TobRD2* lygiai: rezultatai yra parodyti **Figūroje 6** (vientisos linijos nurodo *TobRD2* transkripto lygius dekapituotame augale: skaidytos linijos nurodo *TobRD2* transkripto lygius nedekapituotuose kontroliuojamuose augaluose). Per šešias valandas dekapituotų tabako augalų mRNR lygiai *TobRD2* padidėjo maždaug

aštuoneriopai: kontroliniuose augaluose per tą patį laiko periodą padidėjimo nebuvo.

5 PAVYZDYS

Bakterinio mutanto, kuriam trūksta QPRtazės, papildymas DNR seka SEQ ID NO:1

Echerichia coli kamienas TH265 yra mutantas, kuriam trūksta fosforibozilo chinolato transferazės (*nadC*-), ir tokiu būdu negali augti terpėje, kurioje trūksta nikotino rūgščių.

TD265 ląstelės buvo transformuotos ekspresijos vektoriumi (pWS161), turinčiu DNR seką SEQ ID NO:1, arba transformuotos tiksliai ekspresijos vektoriumi (pKK233). Transformuotos bakterijos augimas buvo palygintas su TH265 (pKK233) transformantų augimu ir su netransformuoto TH265 *nadC*- mutanto augimu. Augimas buvo palygintas ant ME minimalios terpės (kuriai trūksta nikotino rūgšties) ir ant ME minimalios terpės su pridėta nikotino rūgštimi.

E. coli kamienas su QPtazės mutacija (*nadC*), TH265, buvo maloniai pateiktas Dr. K.T. Hughes (Hughes ir kt., *J.Bact.* 175:479 (1993)). Ląstelės buvo palaikomos ant LB terpės ir imliosios ląstelės paruoštos kaip aprašyta Sambrook ir kt. (1989). Ekspresijos plazmidė buvo sukonstruota pKK2233 (Brosius, 1984) su TobRD2 cDNR, klonuota kontroliuojant Tac promotoriui. Gauta plazmidė, pWS161, buvo transformuota į TH265 ląsteles. Transformuotos ląstelės buvo patalpintos minimalioje terpėje (Vogel ir Bonner, 1956) ant agaro lėkščių su arba be nikotino rūgšties (0.0002%) priedu. TH265 ląstelės tokios, kokios yra, ir TH265 transformuotos pKK2233 buvo pasėtos ant tokių pačių lėkščių kontroliniam palyginimui.

Rezultatai yra parodyti **Figūroje 4**. Tik TH265 transformuotos DNR seka **SEQ ID NO:1** augo terpėje, kuriai trūksta nikotino rūgšties. Rezultatai parodo, kad DNR, turinčios seką **SEQ ID NO:1**, ekspresija TH265 bakterinėse ląstelėse suteikė *NadC*– fenotipą šiose ląstelėse, patvirtinantį, kad ši seka koduoja QPRtazę. TobRD2 nomenklatūra tokiu būdu buvo pakeista į *NtQPT1*.

6 PAVYZDYS

Tabako augalų transformacija

Seką SEQ ID NO:1 turinti DNR antisensinėje kryptyje funkcionaliai sujungta su augalo promotoriumi (CaMV 35S arba TobRD2 šaknies žievės specifiniu promotoriumi), kad gamintų dvi skirtingas DNR kasetes: CaMV35S promotoriaus/antisensinę SEQ ID NO:1 ir TobRD2 promotoriaus/antisensinę SEQ ID NO:1.

Transformacijai yra parinktos laukinio tipo tabako linija ir žemo nikotino kiekio tabako linija, pavyzdžiui, laukinio tipo Burley 21 tabakas (*Nic1*– /*Nic2*+) ir homozigotinis *nic1*–/ *nic2*– Burley 21. Dauguma tabako augalo ląstelių iš kiekvienos linijos yra transformuojamos naudojant kiekvieną iš DNR kasečių. Transformacija atliekama naudojant *Agrobacterium* vektorių, pavyzdžiui, *Agrobacterium*- binarinį vektorių, turintį Ti-ribos sekas ir *nptII* geną (suteikiantį atsparumą kanamicinui ir kontroliuojant *nos* promotoriui (*nptII*)).

Transformuotos ląstelės yra atrenkamos ir regeneruojamos į transgeninius tabako augalus (R_0). R_0 augalai yra auginami iki subrendimo ir nustatomi nikotino kiekiai juose: transformuotų tabako augalų subsėjiniai parodo žymiai mažesnius nikotino kiekius, palyginus su netransformuotais standartiniais augalais.

Tada R_0 augalai yra apdulkinami ir transgeno izoliavimas yra analizuojamas R_1 palikuoniuose. R_1 palikuoniai yra auginami iki subrendimo ir apdulkinami: izoliavimas transgeno tarp R_2 palikuonių nurodo, kurie R_1 augalai yra homozigotiniai transgenai.

SEKŲ SĄRAŠAS

(1) BENDRA INFORMACIJA:

- (i) PAREIŠKĖJAI : Conkling, Mark A.
Mendu, Nandini
Song, Wen
- (ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS : Fosforibozilo chinolato transferazės ekspresijos reguliavimas
- (iii) SEKŲ SKAIČIUS : 4
- (iv) KORESPONDENCIJOS ADRESAS :
 - (A) ADRESATAS : Kenneth Sibley, Bell Seltzer Park & Gibson
 - (B) GATVĖ : Post Office Drawer 34009
 - (C) MIESTAS : Charlotte
 - (D) VALSTIJA : North Carolina
 - (E) ŠALIS : JAV
 - (F) PAŠTO INDEKSAS : 28234
- (v) KOMPIUTERINĖ FORMA :
 - (A) LAIKMENA : - diskelis
 - (B) KOMPIUTERIS : IBM PC
 - (C) OPERACINĖ SISTEMA : PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMINĖ ĮRANGA : PatentIn Release #1.0, versija #1.30
- (vi) EINAMOSIOS PARAIŠKOS DUOMENYS :
 - (A) PARAIŠKOS NUMERIS:
 - (B) PADAVIMO DATA:
 - (C) KLASIFIKACIJA:
- (viii) INFORMACIJA APIE PATIKĖTINĮ/AGENTĄ :
 - (A) PAVARDĖ : Sibley, Kenneth D.
 - (B) REGISTRACIJOS NUMERIS : 31, 665
 - (C) REJESTRO NUMERIS : 5051-338P
- (ix) RYŠIO INFORMACIJA :
 - (A) TELEFONAS : 919-420-2200

(B) FAKSAS :919-881-3175

(2) INFORMACIJA SEQ ID NO:1:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA :
 - (A) ILGIS : 1399 bazinių porų
 - (B) TIPAS : nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖ : vienaeilė
 - (D) TOPOLOGIJA : linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS : cDNA
- (ix) POŽYMIAI :
 - (A) PAVADINIMAS/RAKTAS : CDS
 - (B) PADĖTIS : 52..1104
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS : SEQ ID NO:1:

CAAAACTAT TTTCCACAAA ATTCAATTTCA CAACCCCCC AAAAAAAAAAC C ATG TTT	57
Met Phe	
1	
AGA GCT ATT CCT TTC ACT GCT ACA GTG CAT CCT TAT GCA ATT ACA GCT	105
Arg Ala Ile Pro Phe Thr Ala Thr Val His Pro Tyr Ala Ile Thr Ala	
5 10 15	
CCA AGG TTG GTG GTG AAA ATG TCA GCA ATA GCC ACC AAG AAT ACA AGA	153
Pro Arg Leu Val Val Lys Met Ser Ala Ile Ala Thr Lys Asn Thr Arg	
20 25 30	
GTG GAG TCA TTA GAG GTG AAA CCA CCA GCA CAC CCA ACT TAT GAT TTA	201
Val Glu Ser Leu Glu Val Lys Pro Pro Ala His Pro Thr Tyr Asp Leu	
35 40 45 50	
AAG GAA GTT ATG AAA CTT GCA CTC TCT GAA GAT GCT GGG AAT TTA GGA	249
Lys Glu Val Met Lys Leu Ala Leu Ser Glu Asp Ala Gly Asn Leu Gly	
55 60 65	
GAT GTG ACT TGT AAG GCG ACA ATT CTT CTT GAT ATG GAA TCC GAT GCT	297
Asp Val Thr Cys Lys Ala Thr Ile Pro Leu Asp Met Glu Ser Asp Ala	
70 75 80	
CAT TTT CTA GCA AAG GAA GAC GCG ATC ATA GCA GGA ATT GCA CTT GCT	345
His Phe Leu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ala Leu Ala	
85 90 95	
GAG ATG ATA TTC GCG GAA GTT GAT CTT TCA TTA AAG GTG GAG TGG TAT	393
Glu Met Ile Phe Ala Glu Val Asp Pro Ser Leu Lys Val Glu Trp Tyr	
100 105 110	
GTA AAT GAT GGC GAT AAA GTT CAT AAA GGC TTG AAA TTT GGC AAA GTA	441
Val Asn Asp Gly Asp Lys Val His Lys Gly Leu Lys Phe Gly Lys Val	
115 120 125 130	

CAA GGA AAC GCT TAC AAC ATT GTT ATA GCT GAG AGG GTT GTT CTC AAT	489
Gln Gly Asn Ala Tyr Asn Ile Val Ile Ala Glu Arg Val Val Leu Asn	
135 140 145	
TTT ATG CAA AGA ATG AGT GGA ATA GCT ACA CTA ACT AAG GAA ATG GCA	537
Phe Met Gln Arg Met Ser Gly Ile Ala Thr Leu Thr Lys Glu Met Ala	
150 155 160	
GAT GCT GCA CAC CCT GCT TAC ATC TTG GAG ACT AGG AAA ACT GCT CCT	585
Asp Ala Ala His Pro Ala Tyr Ile Leu Glu Thr Arg Lys Thr Ala Pro	
165 170 175	
GGA TTA CGT TTG GTG GAT AAA TGG GCG GTA TTG ATC GGT GGG GGG AAG	633
Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly Gly Lys	
180 185 190	
AAT CAC AGA ATG GGC TTA TTT GAT ATG GTA ATG ATA AAA GAC AAT CAC	681
Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp Asn His	
195 200 205 210	
ATA TCT GCT GCT GGA GGT GTC GGC AAA GCT CTA AAA TCT GTG GAT CAG	729
Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val Asp Gln	
215 220 225	
TAT TTG GAG CAA AAT AAA CTT CAA ATA GGG GTT GAG GTT GAA ACC AGG	777
Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu Thr Arg	
230 235 240	
ACA ATT GAA GAA GTA CGT GAG GTT CTA GAC TAT GCA TCT CAA ACA AAG	825
Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Thr Lys	
245 250 255	
ACT TCG TTG ACT AGG ATA ATG CTG GAC AAT ATG GTT GTT CCA TTA TCT	873
Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro Leu Ser	
260 265 270	
AAC GGA GAT ATT GAT GTA TCC ATG CTT AAG GAG GCT GTA GAA TTG ATC	921
Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu Leu Ile	
275 280 285 290	
AAT GGG AGG TTT GAT ACG GAG GCT TCA GGA AAT GTT ACC CTT GAA ACA	969
Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu Glu Thr	
295 300 305	
GTA CAC AAG ATT GGA CAA ACT GGT GTT ACC TAC ATT TCT AGT GGT GCC	1017
Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser Gly Ala	
310 315 320	
CTG ACG CAT TCC GTG AAA GCA CTT GAC ATT TCC CTG AAG ATC GAT ACA	1065
Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile Asp Thr	
325 330 335	
GAG CTC GCC CTT GAA GTT GGA AGG CGT ACA AAA CGA GCA TGAGCGCCAT	1114
Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala	
340 345 350	

TACTTCTGCT ATAGGGTTGG AGTAAAGCA GCTGAATAGC TGAAAGGTGC AAATAAGAAT 1174
 CATTITACTA GTTGTCAAAC AAAAGATCCT TCACTGTGTA ATCAAACAAA AAGATGTAAA 1234
 TTGCTGGAAT ATCTCAGATG GCTCTTTTCC AACCTTATTG CTTGAGTTGG TAATTTTCATT 1294
 ATAGCTTTGT TTTCATGTTT CATGGAATTT GTTACAATGA AAATACTTGA TTTATAAGTT 1354
 TGGTGTATGT AAAATTCTGT GTTACTTCAA ATATTTTGAG ATGTT 1399

(2) INFORMACIJA SEQ ID NO:2:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS :

- (A) ILGIS : 351 amino rūgštis
- (B) TIPAS : amino rūgštis
- (C) TOPOLOGIJA : linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS : proteinas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS : SEQ ID NO:2:

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

Lys Val Gln Gly Asn Ala Tyr Asn Ile Val Ile Ala Glu Arg Val Val
 130 135 140

Leu Asn Phe Met Gln Arg Met Ser Gly Ile Ala Thr Leu Thr Lys Glu
 145 150 155 160

Met Ala Asp Ala Ala His Pro Ala Tyr Ile Leu Glu Thr Arg Lys Thr
 165 170 175

Ala Pro Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly
 180 185 190

Gly Lys Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp
 195 200 205

Asn His Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val
 210 215 220

Asp Gln Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu
 225 230 235 240

Thr Arg Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln
 245 250 255

Thr Lys Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro
 260 265 270

Leu Ser Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu
 275 280 285

Leu Ile Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu
 290 295 300

Glu Thr Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser
 305 310 315 320

Gly Ala Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile
 325 330 335

Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala
 340 345 350

(2) INFORMACIJA SEQ ID NO:3:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA :

- (A) ILGIS : 1053 bazinių porų
- (B) TIPAS : nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖ : vienguba
- (D) TOPOLOGIJA : linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS : cDNA

(xi) SEKOS APRAŠYMAS : SEQ ID NO:3:

```

ATGTTTAGAG CTATTCCTTT CACTGCTACA GTGCATCCTT ATGCAATTAC AGCTCCAAGG      60
TTGGTGGTGA AAATGTCAGC AATAGCCACC AAGAATACAA GAGTGGAGTC ATTAGAGGTG      120
AAACCACCAG CACACCCAAC TTATGATTTA AAGGAAGTTA TGAAACTTGC ACTCTCTGAA      180
GATGCTGGGA ATTTAGGAGA TGTGACTTGT AAGGCGACAA TTCCTCTTGA TATGGAATCC      240
GATGCTCATT TTCTAGCAA GGAAGACGGG ATCATAGCAG GAATTGCACT TGCTGAGATG      300
ATATTCGCGG AAGTTGATCC TTCATTAAAG GTGGAGTGGT ATGTAAATGA TGGCGATAAA      360
GTTCATAAAG GCTTGAAATT TGGCAAAGTA CAAGGAAACG CTTACAACAT TGTTATAGCT      420
GAGAGGGTTG TTCTCAATTT TATGCAAAGA ATGAGTGGAA TAGCTACACT AACTAAGGAA      480
ATGGCAGATG CTGCACACCC TGCTTACATC TTGGAGACTA GGAAACTGCT TCCTGGATTA      540
CGTTTGGTGG ATAAATGGGC GGTATTGATC GGTGGGGGGA AGAATCACAG AATGGGCTTA      600

TTTGATATGG TAATGATAAA AGACAATCAC ATATCTGCTG CTGGAGGIGT CGSCAAAGCT      660
CTAAATCTG TGGATCAGTA TTTGGAGCAA AATAAACTTC AAATAGGGGT TGAGGTTGAA      720
ACCAGGACAA TTGAAGAAGT ACGTGAGGTT CTAGACTATG CATCTCAAAC AAAGACTTCG      780
TTGACTAGGA TAATGCTGGA CAATATGGTT GTTCCATTAT CTAACGGAGA TATTGATGTA      840
TCCATGCTTA AGGAGGCTGT AGAATTGATC AATGGGAGGT TTGATACGGA GGCTTCAGGA      900
AATGTTACCC TTGAAACAGT ACACAAGATT GGACAACTG GTGTTACCTA CATTTCTAGT      960
GGTGCCCTGA CGCATTCCGT GAAAGCACTT GACATTTCCC TGAAGATCGA TACAGAGCTC     1020
GCCCTTGAAG TTGGAAGGCG TACAAAACGA GCA                                     1053

```

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Izoliuota DNR molekulė, turinti seką, parinktą iš grupės, susidedančios iš:

- (a) sekos **SEQ ID NO:1**;
- (b) DNR sekų, kurios koduoja fermentą, turintį seką **SEQ ID NO:2**;
- (c) DNR sekų, kurios hibridizuojasi su izoliuota DNR iš (a) arba iš (b), anksčiau paminėtų, ir kurios koduoja fosforibozilo chinolato transferazės fermentą; ir
- (d) DNR sekų, kurios skiriasi nuo DNR (a), (b) arba (c), anksčiau paminėtų, dėl genetinio kodo degeneracijos.

2. DNR konstrukcija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi ekspresijos kasetę, kai konstrukcija kryptimi nuo 5' iki 3' turi promotorių, veikiantį augalo ląstelėje, ir DNR molekulę pagal 1 punktą, išdėstytą pasroviui nuo minėto promotoriaus, ir funkcionaliai sujungtą su juo.

3. DNR konstrukcija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta DNR molekulė yra antisensinėje orientacijoje.

4. DNR konstrukcija b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kryptimi nuo 5' iki 3' turi promotorių, veikiantį augalo ląstelėje, ir DNR pagal 1 punktą, koduojančią augalo fosforibozilo chinolato transferazę, kai minėta DNR yra funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi.

5. DNR konstrukcija b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kryptimi nuo 5' iki 3' turi promotorių, veikiantį augalo ląstelėje ir DNR pagal 1 punktą, koduojančią augalo fosforibozilo chinolato transferazę, kai minėta DNR yra antisensinėje orientacijoje ir funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi.

6. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos promotorius yra struktūriškai aktyvus augalo ląstelėse.

7. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos promotorius yra selektyviai aktyvus augalo šaknų audinio ląstelėse.

8. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos promotorius yra selektyviai aktyvus augalo šaknų žievės audinio ląstelėse.

9. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta konstrukcija toliau turi plazmidę.

10. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra pernešama augalo transformacijos vektoriaus.

11. DNR konstrukcija pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra pernešama augalo transformacijos vektoriaus, kuris yra *Agrobacterium tumefaciens* vektorius.

12. Augalo ląstelė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi DNR konstrukciją pagal 2, 3, 4 arba 5 punktą.

13. Transgeninis augalas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi augalo ląstelių pagal 12 punktą.

14. Peptidas, turintis seką **SEQ ID NO:2**.

15. Peptidas, koduojamas DNR sekos, parinktos iš grupės, susidedančios iš:

- (a) sekos **SEQ ID NO:1**:
- (b) DNR sekų, kurios hibridizuojasi su izoliuota DNR iš (a), anksčiau paminėtos, ir kurios koduoja fosforibozilo chinolato transferazės fermentą; ir
- (c) DNR sekų, kurios skiriasi nuo DNR iš (a), arba iš (b), anksčiau paminėtų, dėl genetinio kodo degeneracijos.

16. Transgeninio augalo ląstelės, turinčios sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, gamybos būdas **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad minėtas būdas apima:

augalo ląstelės, kuri žinoma kaip ekspresuojanti fosforibozilo chinolato transferazę, sukūrimą;

egzogeninės DNR konstrukcijos, kuri kryptimi nuo 5' iki 3' turi promotorių, veikiantį augalo ląstelėje, ir DNR pagal 1 punktą, apimančią dalį sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, kai minėta DNR funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi, sukūrimą; ir

minėtos augalo ląstelės transformavimą minėta DNR konstrukcija, norint gauti transformuotas ląsteles, kai minėta augalo ląstelė, turi sumažintą QPRtazės ekspresiją, palyginus su netransformuota ląstele.

17. Būdas pagal 16 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad minėta DNR, apimanti dalį sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, yra antisensinėje orientacijoje.

18. Būdas pagal 16 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad minėta DNR, apimanti dalį sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, yra sensinėje orientacijoje.

19. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta augalo ląstelė yra *Nicotiana tabacum*.

20. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dar apima augalo iš minėtos transformuotos augalo ląstelės regeneravimą.

21. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas promotorius yra struktūriškai aktyvus.

22. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas promotorius yra selektyviai aktyvus augalo šaknų audinio ląstelėse.

23. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas promotorius yra selektyviai aktyvus augalo šaknų žievės audinio ląstelėse.

24. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta transformavimo pakopa yra atliekama bombarduojant minėtą augalo ląstelę mikrodalelėmis, pernešančiomis minėtą DNR konstrukciją.

25. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta transformavimo pakopa yra atliekama infekuojant minėtą augalo ląstelę *Agrobacterium tumefaciens*, turinčia Ti plazmidę, pernešančią minėtą DNR konstrukciją.

26. Transgeninio tabako sėklų gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sėklas surenka iš transgeninio tabako augalo, gauto būdu pagal 19 punktą.

27. Būdas pagal 16 punktą b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėta egzogeninė DNR seka yra komplementari (papildančioji) minėjai fosforibozilo chinolato transferazės informacinei RNR (QPRT mRNR), ekspresuotai minėtos augalo ląstelės regione, parinktame iš:

- (a) 5'-netransliuotos sekos minėtos QPRT mRNR:
- (b) 3'-netransliuotos sekos minėtos QPRT mRNR: ir
- (c) transliuoto regiono minėtos QPRT mRNR.

28. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėta egzogeninė DNR seka yra komplementari (papildančioji) mažiausiai 15 nukleotidų minėtos fosforibozilo chinolato transferazės informacinės RNR, ekspresuotos minėtoje augalo ląstelėje.

29. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėta egzogeninė DNR seka yra komplementari (papildančioji) mažiausiai 200 nukleotidų minėtos fosforibozilo chinolato transferazės informacinės RNR, ekspresuotos minėtoje augalo ląstelėje.

30. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėta egzogeninė DNR seka apima fosforibozilo chinolato transferazę, koduojančią seką, parinktą iš DNR sekų, aprašytų 1 punkte.

31. Transgeninis augalas iš rūšių *Nicotiana*, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRTazės) ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu, kai minėtas transgeninis augalas apima transgenines augalo ląsteles, turinčias:

egzogeninės DNR konstrukciją, kryptimi nuo 5' iki 3' apimančią promotorių, veikiantį minėtoje ląstelėje, ir DNR, turinčią segmentą DNR sekos pagal 1 punktą, koduojančios augalo fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, kai minėta DNR funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi:

ir minėtas augalas parodo sumažintą QPRTazės ekspresiją, palyginus su netransformuotu kontroliniu augalu.

32. Transgeninis augalas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėtas segmentas DNR, apimančios segmentą DNR sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, yra antisensinėje orientacijoje.

33. Transgeninis augalas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėtas segmentas DNR, apimančios segmentą DNR sekos, koduojančios fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, yra sensinėje orientacijoje.

34. Transgeninis augalas iš rūšių *Nicotiana*, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu, kur minėtas transgeninis augalas yra palikuonis augalo pagal 31 punktą.

35. Sėklos, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad yra iš transgeninio augalo rūšių *Nicotiana*, turinčio sumažintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, proporcingą netransformuotam kontroliniam augalui, kur minėtas transgeninis augalas yra augalas pagal 31 punktą arba jo palikuonis.

36. Derlius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima daugybę augalų pagal 31 punktą, pasodintų kartu agrokultūriniame lauke.

37. Fosforibozilo chinolato transferazės geno ekspresijos sumažinimo būdas augalo ląstelėje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima:

auginimą augalo ląstelės, transformuotos taip, kad turėtų egzogeninę DNR pagal 1 punktą, kur minėtos DNR transkribuota vija yra komplementari (papildančioji) fosforibozilo chinolato transferazės mRNR, endogeninei minėtai ląstelei, kai minėtos papildančiosios vijos transkripcija sumažina minėto fosforibozilo chinolato geno ekspresiją.

38. Tabako augalo, turinčio sumažintus nikotino lygius minėto tabako augalo lapuose, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima:

auginimą tabako augalo arba anksčiau minėtų palikuonių augalų, kur minėtas augalas turi ląsteles, apimančias DNR konstrukciją, turinčią transkripcinį iniciacijos regioną, funkcionuojantį minėtame augale ir egzogeninę DNR seką pagal 1 punktą, funkcionaliai sujungtą su minėtu transkripciniu iniciacijos regionu, kur transkribuota minėtos DNR sekos vija yra komplementari (papildančioji) endogeninei fosforibozilo chinolato transferazės informacinei RNR minėtose ląstelėse.

39. Transgeninės augalo ląstelės, turinčios padidintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima:

gavimą augalo ląstelės, ekspresuojančios fosforibozilo chinolato transferazę:

gavimą egzogeninės DNR konstrukcijos, kai konstrukcija kryptimi nuo 5' iki 3' apima promotorių, veikiantį augalo ląstelėje, ir DNR seką pagal 1 punktą, koduojančią fosforibozilo chinolato transferazę, kai minėta DNR seka yra funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi: ir

transformavimą minėtos augalo ląstelės minėta DNR konstrukcija, gaunant transformuotas ląsteles, kai minėta augalo ląstelė turi padidintą QPRtazės ekspresiją, lyginant su netransformuota ląstele.

40. Transgeninis augalas iš rūšių *Nicotiana*, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi padidintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu, kai minėtas transgeninis augalas apima transgenines augalo ląsteles, turinčias:

egzogeninės DNR konstrukciją kryptimi nuo 5' iki 3' apimančią promotorių, veikiantį minėtoje ląstelėje, ir DNR seką pagal 1 punktą, koduojančią

augalo fosforibozilo chinolato transferazę, kai minęta DNR funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi:

kai minėtas augalas parodo padidintą QPRtazės ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu.

41. Transgeninis augalas iš rūšių *Nicotiana*, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi padidintą fosforibozilo chinolato transferazės (QPRtazės) ekspresiją, lyginant su netransformuotu kontroliniu augalu, kur minėtas transgeninis augalas yra palikuonis augalo pagal 40 punktą.

42. Fosforibozilo chinolato transferazės geno ekspresijos padidrinimo būdas augalo ląstelėje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima:

auginimą augalo ląstelės, transformuotos taip, kad turėtų egzogeninę DNR pagal 1 punktą, kurioje minėta egzogeninė DNR koduoja fosforibozilo chinolato transferazę.

43. Būdas pagal 42 punktą b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėtas transformuota augalo ląstelė yra gaunama būdu, apimančiu:

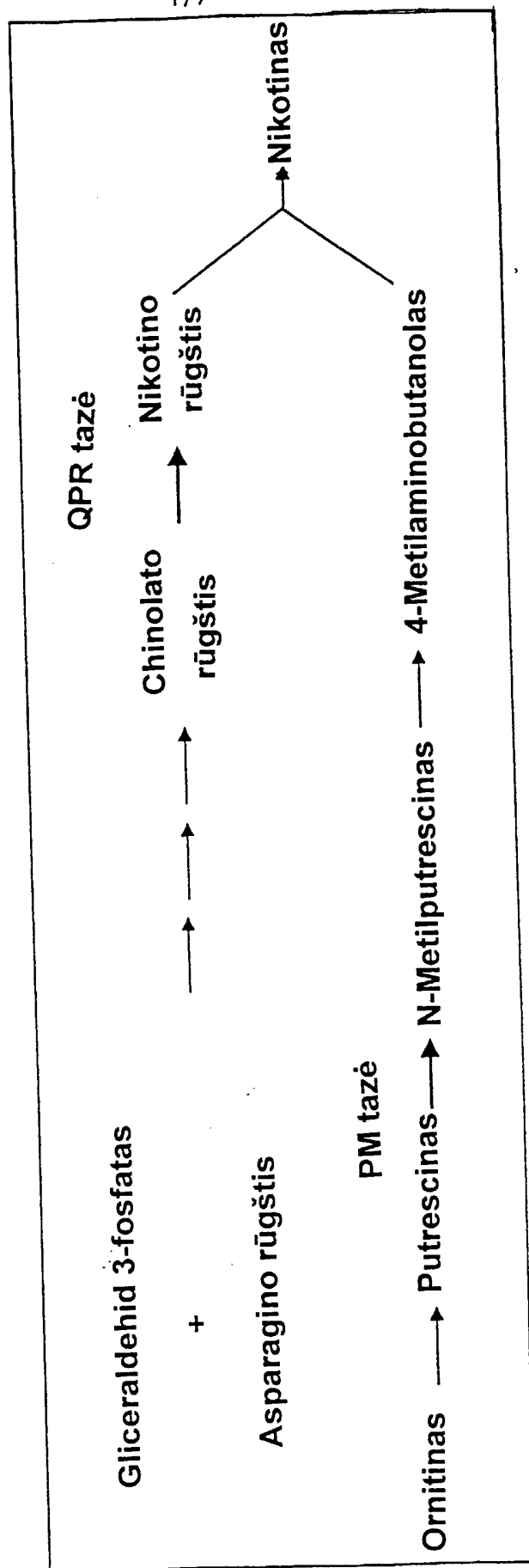
genomo konstrukcijos integravimą į pagrindinio augalo ląstelę, transkripcijos kryptyje turinčią promotorių, funkcionuojantį minėtoje augalo ląstelėje, DNR seką, koduojančią fosforibozilo chinolato transferazę, funkcionuojančią minėtoje ląstelėje, kai minėta DNR seka funkcionaliai sujungta su minėtu promotoriumi, ir transkripcijos nutraukimo regioną, funkcionuojantį minėtoje ląstelėje, kai transformuota augalo ląstelė yra gaunama.

44. Tabako augalo, turinčio padidintus nikotino lygius minėto tabako augalo lapuose, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas apima:

auginimą tabako augalo arba anksčiau minėtų palikuonių, kur minėtas augalas turi ląsteles, apimančias DNR konstrukciją, turinčią transkripcinį iniciacijos regioną, funkcionuojantį minėtame augale ir egzogeninę DNR seką

pagal 1 punktą, funkcionaliai sujungtą su transkripcijos iniciacijos regionu, kai minėta DNR seka koduoja fosforibozilo chinolato transferazę, funkcionuojančią minėtose ląstelėse.

FIG. 1



2/7

```

caaaaactat tttccacaaa attcatttca caaccccccc aaaaaaaaaac cATGTTTAGA 60
GCTATTCCTT TCACTGCTAC AGTGCATCCT TATGCAATTA CAGCTCCAAG GTTGGTGGTG 120
AAAATGTCAG CAATAGCCAC CAAGAATACA AGAGTGGAGT CATTAGAGGT GAAACCACCA 180
GCACACCCAA CTTATGATTT AAAGGAAGTT ATGAAACTTG CACTCTCTGA AGATGCTGGG 240
TTTCTAGCAA AGGAAGACGG GATCATAGCA GGAATTGCAC TTGCTGAGAT GATATTCGCG 360
GAAGTTGATC CTTCAATAAA GGTGGAGTGG TATGTAAATG ATGGCGATAA AGTTCATAAA 420
GGCTTGAAAT TTGGCAAAGT ACAAGGAAAC GCTTACAACA TTGTTATAGC TGAGAGGGTT 480
GTTCTCAATT TTATGCAAAG AATGAGTGGG ATAGCTACAC TAACTAAGGA AATGGCAGAT 540
GCTGCACACC CTGCTTACAT CTTGGAGACT AGGAAACTG CTCCTGGATT ACGTTTGGTG 600
GATAAATGGG CGGTATTGAT CGGTGGGGGG AAGAATCACA GAATGGGCTT ATTTGATATG 660
GTAATGATAA AAGACAATCA CATATCTGCT GCTGGAGGTG TCGGCAAAGC TCTAAAATCT 720
GTGGATCAGT ATTTGGAGCA AAATAAAGTT CAAATAGGGG TTGAGGTTGA AACCAGGACA 780
ATTGAAGAAG TACGTGAGGT TCTAGACTAT GCATCTCAA CAAAGACTTC GTTGACTAGG 840
ATAATGCTGG ACAATATGGT TGTTCCATTA TCTAACGGAG ATATTGATGT ATCCATGCTT 900
AAGGAGGCTG TAGAATTGAT CAATGGGAGT- TTTGATACGG AGGCTTCAGG AAATGTTACC 960
CTTGAAACAG TACACAAGAT TGGACAACT GGTGTTACCT ACATTTCTAG TGGTGCCCTG 1020
ACGCATTCCG TGAAAGCACT TGACATTTCC CTGAAGATCG ATACAGAGCT CGCCCTTGAA 1080
GTTGGAAGGC GTACAAAACG AGCATGAgcg ccattacttc tgctataggg ttggagtaaa 1140
agcagctgaa tagctgaaag gtgcaaataa gaatcatttt actagtgtgc aaacaaaaga 1200
tccttcactg tgtaatcaaa caaaaagatg taaattgctg gaatatctca gatggctcct 1260
ttccaacctt attgcttgag ttggaatttt cattatagct ttgttttcat gtttcatgga 1320
atgtgttaca atgaaaatac ttgatttata agtttggtgt atgtaaaatt ctgtgttact 1380
tcaaataatt tgagatgtt 1399

```

FIG. 2A

```

MFRAIPFTAT VHPYAITAPR LVVKMSAIAT KNTRVESLEV KPPAHPTYDL 50
KEVMKLALSE DAGNLGDVTC KATIPDMES DAHFLAKEDG IIAGIALAEM 100
IFAEVDPSLK VEWYVNDGDK VHKGLKFGKV QGNAYNIVIA ERVVLNFMQR 150
MSGIATLTKE MADAHPAYI LETRKTAPGL RLVDKWAVLI GGGKNHRMGL 200
FDMVMIKDNH ISAAGGVGKA LKSVDQYLEQ NKLQIGVEVE TRTIEEVREV 250
LDYASQTKTS LTRIMLDNMV VPLSNGDIDV SMLKEAVELI NGRFDTEASG 300
NVTLETVHKI GQTGVTYISS GALTHSVKAL DISLKIDTEL ALEVGRRTKR 350
A 351

```

FIG. 2B

3/7

N. tabacum	MFRAIPFTATVHPYAITAPRLVVKMSAIATKNTRVESLEVKPPAHPTYDL
R. rubrum	*-----RPNH-----PVAALS*F----AI
M. leprae	*-----LSDC-----EFDAAR-----
S. typhimurium	*-----PPRR*NPDDR*-----DALL*RINLDI*A----AV
E. coli	*-----PPRR*NPDR*-----DELL*RINLDI*G----AV
H. sapien	*-----D*EG*ALLLPVTLAALVDSWLREDC*G-----
S. cerevisiae	*-----PVYE-HLLPVNGAWRQDVTNWLSQDV*S-----
N. tabacum	KEVMKLALSEDAGNLGDOVTCKATIPLOMESDAHFLAKEDGIIAGIA----
R. rubrum	D*AVRR**A**L*RA**I*ST****AATRAH*RFV*RQP**L**LGCA--
M. leprae	-DTIRR**H**LRYGL*I*TQ**V*AGTVVTGSMVPR*P*VIAGVDVALL
S. typhimurium	AQALREDLGGEVDAGN*I*AQL-L*A*TQAH*TVITR*D*VF----CGKR
E. coli	AQALREDLGGTVDANN*I*A*L-L*ENSR*H*TVITR*N*VF----CGKR
H. sapien	-----LNYAALVSGAGP*QAALWAKSP*VL----AGQP
S. cerevisiae	-----FDFGGYVVGSDLK*ANLYCKQD*ML----CGVP
N. tabacum	-LAEMIFAEVDPSPKVEWYVNDGDKVHKGLK-----FGKVQGNAYNIVI
R. rubrum	--RSAF-ALLDDTVFTTPLE**AEIAA*QT-----VAE*A*A*RT*LA
M. leprae	VLD*VF-GVDGYRVLY--R*E**ARLQS*QP-----LLTVQAA*RGLLT
S. typhimurium	WVE*VFIQLAGDOVRLT*H*D***AI*ANQT-----VFELN*PARVLLT
E. coli	WVE*VFIQLAGDOVTII*H*D***VINANQS-----LFELE*PSRVLLT
H. sapien	FFDAIFTQL--NCQVS*FLPE*S*LVPVAR-----VAEVR*P*HDLTL
S. cerevisiae	FAW*VFNQC---ELQVE*LFKE*SFLEPSKNDSGKIVVAKIT*P*K**LL
N. tabacum	AERVVLNFMQRMMSGIATLTKEAD--AAH--PAYILETRKTAPGLRLVOK
R. rubrum	***TA***LGHL*****R*RRFG*AI*HT--R*RLTC****T****GLE*
M. leprae	***TM***VCHM*****V*VAWV*AVRGT--K*KIRD*****L****ALQ*
S. typhimurium	G**TA***V*TL**VASEVRRYVGLL*GT--QTQL*D****L****TAL*
E. coli	G*PTA***V*TL**VASKVRHYVELLEGT--NTQL*D****L****SAL*
H. sapien	G***A**TLARC****SAAAAVEAARGAGWTGHVAG*****T**F***E*
S. cerevisiae	***TA**ILSR****TASHKIIISLARSTGYKGTIAG*****T****RLE*
N. tabacum	WAVLIGGGKNHRMGLFDMVMIKDNHISAAGGVGKALKSVDQYLEQNKLQI
R. rubrum	Y**RC***S***F**D*A*L*****AVA***SA**SRAR-AGVGHMVRI
M. leprae	Y**RV***V***L**G*TAL*****VA*V*S*VD**RA*R-AAAPEL-PC
S. typhimurium	Y***C***A***L**T*AFL*****I*S*S*RQ*VEKAF-W*HPD-APV
E. coli	Y***C***A***L**S*AFL*****I*S*S*RQ*VEKAS-W*HPD-APV
H. sapien	YGL*V**AAS**YD*GGLVML*D**VVP***EK*VRAARQ---AADFAL
S. cerevisiae	YSM*V**CDT**YD*SS**ML*D***W*T*SITN*V*NARA---VCGFAV

N. tabacum GVEVETRTIEEVREVLDYASQTKTSLTRIMLDNMVVPLSNGDIDVSMKE
 R. rubrum EI****--L*QLA***AVGGAEV-----VL****-----DAPT----*TR
 M. leprae E****S--L*QLDAM*A-EEPEL-----*L***F--*VWQTQV----AVQ
 S. typhimurium E****N--LDELDDA*K-*GADI-----*****F-----NTDQ----MR*
 E. coli E****N--L**LD*A*K-*GADI-----*****F-----ETEQ----MR*
 H. sapien K****CSSLQ**VQAAE-*GADL-----VL***F-----KPEELHPTAT
 S. cerevisiae KI***CLSED*AT*AIE-*GADV-----*****F-----KGDGLK*CAQ

N. tabacum AVELI---NGRFDTEASGNVTLETVHKIG-QTGVITYISSGALTHSVKALD
 R. rubrum **DMV---A**LV*****G*S*D*IAALA-ES**D***V*****TT**
 M. leprae RRDIR---APTVELL*S**GLS**NAAIYA-G***DYLAV*****RI**
 S. typhimurium **KRV---**QARL*V*****AE*LREFA-E***DF**VG*****R***
 E. coli **KRT---**KALL*V*****DK*LREFA-E***DF**V*****Q***
 H. sapien *LKAQFPSVA---VEA**GIT*DNLPQF-CGPHIDV**M*M**QA*P***
 S. cerevisiae SLKNKWNGKKHFLLEC**GLN*DNLEEYLCD-DIDIIY*TSSIHQGTPI*

		% Tapatybė	% Panašumas
N. tabacum	ISKLIDTELALVGRRTKRA		
R. rubrum	*G*D*VVA-----PPKAERA	15.9	43.2
M. leprae	*G*DL	18.3	37.3
S. typhimurium	LSMRFC	18.2	34.8
E. coli	LSMRFR	17.9	32.8
H. sapien	F***L---F*K*VAPVP*IH	16.8	31.7
S. cerevisiae	F***LAH	14.6	27.8

FIG. 3 tęsinys

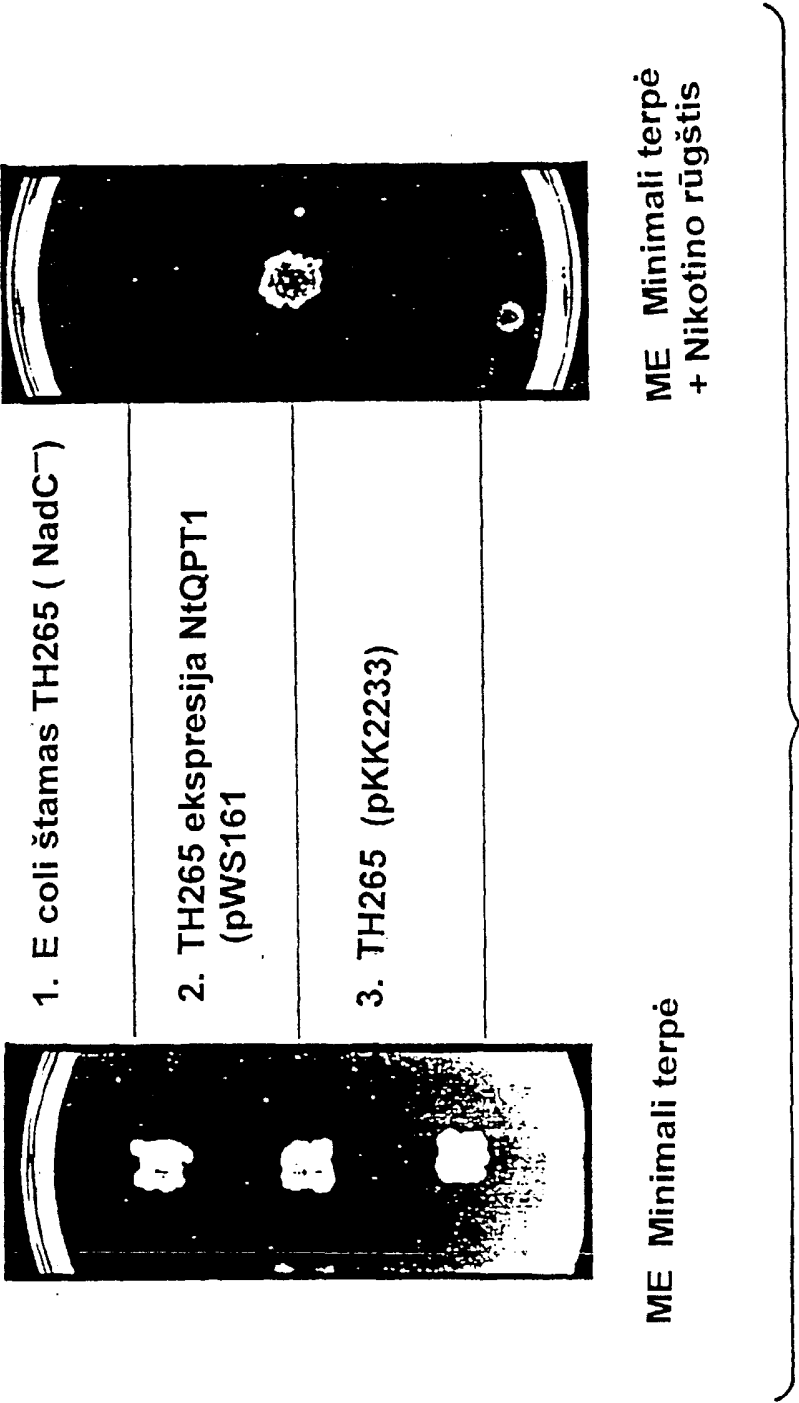


FIG.4

6/7

FIG. 5

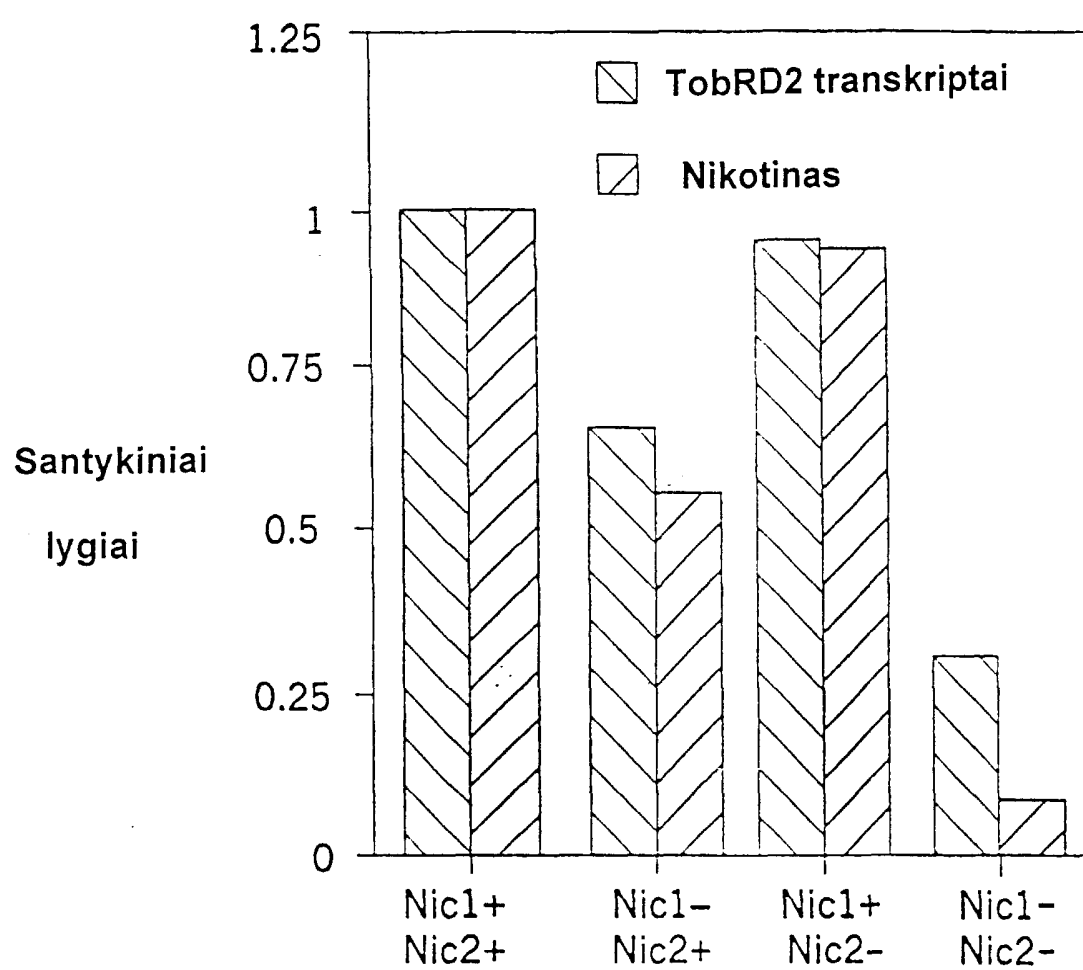


FIG. 6

