

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201201004** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2013.02.28

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2011.01.13

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ МИНИМИЗАЦИИ
СИНТЕЗА НОРНИКОТИНА В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА**

(31) 61/295,671

(32) 2010.01.15

(33) US

(86) PCT/US2011/021088

(87) WO 2011/088180 2011.07.21

(71) Заявитель:

**НОРТ КАРОЛИНА СТЕЙТ
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:

Дьюи Ралф Э., Льюис Рамси С. (US)

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(57) В заявке описаны композиции и способы снижения уровня норникотина и N'-нитрозонорникотина (NNN) в растениях и частях растений табака. Композиции содержат выделенные полинуклеотиды и полипептиды специфических для корня никотиндеметилаз, CYP82E10, и их вариантов, которые принимают участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в этих растениях. Композиции, предлагаемые в изобретении, включают также растения или части растения табака, которые содержат мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E10, при этом мутация приводит в пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10. В заявке описаны также семена указанных растений табака или их потомство и табачные изделия, полученные из растений табака, предлагаемых в изобретении, или из частей растений или их потомства. В заявке описаны также способы уменьшения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилаз, при этом мутация снижает экспрессию гена никотиндеметилазы и при этом первый из указанных генов никотиндеметилаз кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, участвующую в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или частях растения табака. Способы находят применение в производстве табачных изделий, имеющих пониженные уровни норникотина и его онкогенного метаболита NNN, снижая тем самым онкогенный потенциал для индивидуумов, которые потребляют указанные табачные изделия или подвергаются воздействию вторичного дыма, образуемого из указанных изделий.

A1

201201004

201201004

A1

5

10

15

Заявка № 201201004

Заявитель НОРТ КАРОЛИНА СТЕЙТ
ЮНИВЕРСИТИ, US

20

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ МИНИМИЗАЦИИ
СИНТЕЗА НОРНИКОТИНА В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА****Информация о включении перечня последовательностей**

Официальная копия перечня последовательностей предоставляется через EFS-Web в виде электронной версии перечня последовательностей в формате ASCII (американский стандартный код обмена информацией), файл обозначен как «400712SequenceListing.txt», он создан 12 января 2011 г., имеет размер 149 кБ и зарегистрирован одновременно с описанием изобретения. Перечень последовательностей, входящий в указанный документ в формате ASCII, представляет собой часть описания изобретения и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

30

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, предназначенным для минимизации синтеза норникотина и, следовательно, его

метаболита N'-нитрозонорникотина, в растениях и частях растений табака, прежде всего к композициям и способам, предназначенным для ингибирования экспрессии или функции специфической для корня никотиндеметилазы в сочетании с никотиндеметилазой зеленых листьев и индуцированной старением никотиндеметилазой.

Предпосылки создания изобретения

Преобладающим алкалоидом, присутствующим в коммерческих сортах табака, является никотин, на долю которого, как правило, приходится 90 - 95% от общего пула алкалоидов. Остальная часть алкалоидной фракции состоит в основном из трех дополнительных пиридиновых алкалоидов: норникотина, анабазина и анатабина. Норникотин образуется непосредственно из никотина в результате активности фермента никотин-N-деметилазы. На долю норникотина, как правило, приходится менее 5% от общего пула пиридиновых алкалоидов, но в результате процесса, который называют «превращением (конверсией)», растения табака, в которых первоначально продуцируются очень небольшие количества норникотина, дают потомство, в котором происходит метаболическое «превращение» большого процента присутствующего в листьях никотина в норникотин. В растениях табака, которых подвергали генетическому превращению (обозначены как «конвертеры») основная часть производства норникотина имеет место в процессе старения и сушки зрелых листьев (томление) (Wernsman и Matzinger, Tob. Sci. 12, 1968, сс. 226-228). Табак сорта Бёрли особенно подвержен генетическому превращению, уровень которого для некоторых культиваров достигает 20% на поколение.

В процессе сушки и переработки листьев табака часть норникотина в результате метаболизма превращается в такое соединение, как N-нитрозонорникотин (NNN), специфический для табака нитрозамин (TSNA), который, как было установлено в опытах на лабораторных животных, является канцерогенным (Hecht и Hoffmann, Cancer Surveys 8, 1990, сс. 273-294; Hoffmann и др., J. Toxicol. Environ. Health 41, 1994, сс.1-52; Hecht, Chem. Res. Toxicol. 11, 1998, сс. 559-603). Было установлено, что при трубоогневой сушке табака TSNA формируются главным образом в результате взаимодействия алкалоидов с очень небольшими количествами оксидов азота, которые присутствуют в газообразных продуктах сгорания, образующихся в системах прямого огневого нагрева,

используемых в традиционных сушильных амбарах (Peele и Gentry, «Formation of Tobacco-specific Nitrosamines in Flue-cured Tobacco», CORESTA Meeting, Agro-Phyto Groups, Сучжоу, Китай, 1999). Переоснащение этих сушильных амбаров теплообменниками фактически устраняет смешение газообразных
5 продуктов сгорания с воздухом, применяемым для сушки, и резко снижает образование TSNA в листьях табака, которые подвергали сушке таким образом (Boyette и Hamm, Rec. Adv. Tob. Sci. 27, 2001, сс. 17-22.). В противоположность этому, в подвергаемом воздушной сушке табаке сорта Бёрли образование TSNA происходит, прежде всего, в результате взаимодействия алкалоидов табака с
10 нитритом, этот процесс катализируется живущими в листьях микроорганизмами (Bush и др., Rec. Adv. Tob. Sci. 27, 2001, сс. 23-46). В результате попытки снизить уровень TSNA посредством модификации условий сушки с сохранением при этом соответствия стандартам качества оказались безуспешными для табака, подвергаемого воздушной сушке.

15 Результаты современных исследований позволяют предположить, что норникотин, присутствующий в табачных изделиях, помимо того, что он служит в качестве предшественника NNN, может оказывать дополнительные нежелательные воздействия на здоровье. Dickerson и Janda (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2002, сс. 15084-15088) продемонстрировали, что норникотин вызывает
20 неправильную гликацию белков в клетке.

Обнаружено, что в плазме курильщиков концентрации модифицированных норникотином белков являются существенно более высокими по сравнению с плазмой некурящих. В этом же исследовании установлено, что норникотин может ковалентно модифицировать обычно назначаемые стероидные
25 лекарственные средства, такие как преднизон. Указанные модификации могут изменять как эффективность, так и токсичность указанных лекарственных средств. Кроме того, опубликованы результаты исследований, в которых установлена связь норникотина, присутствующего в табачных изделиях, с
30 возрастной дегенерацией желтого пятна, врожденными дефектами и болезнью периодонта (Brogan и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 10433-10438; Katz и др., J. Periodontal. 76, 2005, сс. 1171-1174).

В табаке сорта Бёрли обнаружена положительная корреляция между содержанием норникотина в листьях и количеством NNN, накапливаемом в

высушенном продукте (Bush и др., Rec. Adv. Tob. Sci, 27, 2001, сс. 23-46; Shi и др., Tob. Chem. Res. Conf. 54, реферат 27, 2000). Таким образом, стратегии, обеспечивающие эффективное снижение содержания норникотина в листьях, могут не только сами по себе способствовать снижению потенциальных негативных воздействий норникотина на состояние здоровья, что описано выше, но также могут параллельно снижать уровни NNN. Указанная корреляция нашла дополнительное подтверждение в современном исследовании Lewis и др., Plant Biotech. J. 6, 2008, сс. 346-354, в котором продемонстрировано, что снижение уровней норникотина с использованием трансгенной конструкции для РНКi (РНК-интерференция), мишенью которой является ген *CYP82E4v2*, кодирующий индуцируемую старением никотиндеметилазу, приводит к сопутствующему снижению содержания NNN в высушенном листе. Хотя в указанном исследовании продемонстрировано, что для значительного снижения содержания норникотина и NNN в табаке можно применять трансгенные технологии, сочетание проблем, связанных с общественным мнением и интеллектуальной собственностью, очень затрудняет их применения для коммерциализации продуктов, полученных из трансгенных растений.

Таким образом, существует выраженная потребность в способах эффективной минимизации накопления норникотина в табаке, которая не основана на применении трансгенов.

Краткое изложение сущности изобретения

Предложены композиции и способы, предназначенные для минимизации содержания норникотина в растениях и частях растений табака. Композиции содержат выделенный специфический для корней полинуклеотид цитохрома P450, обозначенный как полинуклеотид *CYP82E10*, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 1, и кодируемый им полипептид никотиндеметилазы *CYP82E10*, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 2, и его варианты и фрагменты, включая (но, не ограничиваясь только ими) полипептиды, которые имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, а также полинуклеотиды, которые кодируют полипептид, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13. Полипептид *CYP82E10*, предлагаемый в изобретении, представляет собой никотиндеметилазу, которая принимает участие в

метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений табака. Выделенные полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают также полинуклеотиды, которые содержат последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или 4, и ее варианты и фрагменты. Композиции, предлагаемые в изобретении, включают также растения или части растений табака, которые имеют мутацию в гене, кодирующем никотиндеметиразу CYP82E10, при этом мутация приводит к снижению экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E10. В некоторых вариантах осуществления изобретения растения табака, предлагаемые в изобретении, содержат также мутацию в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E4, и/или мутацию в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E5, при этом мутация в этих генах приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметиразы CYP82E4 или CYP82E5. Изобретение относится также к семенному материалу этих растений табака или их потомству и к табачным изделиям, приготовленным из растений табака, предлагаемых в изобретении, или из частей этих растений или их потомства.

Предложены также способы снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или частях растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметиразы, где мутация снижает уровень экспрессии гена никотиндеметиразы, и где первый из этих генов никотиндеметиразы кодирует специфическую для корня никотиндеметиразу, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях или частях растений табака. В некоторых вариантах осуществления изобретения специфическая для корня никотиндеметиразы представляет собой CYP82E10 или ее вариант. В других вариантах осуществления изобретения способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметиразы, который кодирует CYP82E10 или ее вариант, и мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметиразы, который кодирует CYP82E4 или ее вариант, и/или гена никотиндеметиразы, который кодирует CYP82E5 или ее вариант. Описаны также способы идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, в

которых растения или часть растения подвергают скринингу в отношении присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E10 или ее вариант, индивидуально или в сочетании со скринингом в отношении присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E4 или ее вариант, и/или присутствия мутации в гене, который кодирует CYP82E5 или ее вариант.

Под объем изобретения подпадают следующие варианты осуществления.

1. Растение или часть растения табака, содержащее/содержащая мутацию в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10.

2. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 1, где никотиндеметилаза CYP82E10 имеет последовательность, выбранную из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8 и 9.

3. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 1 или 2, где мутация приводит к модификации никотиндеметилазы CYP82E10 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 79, 107, 382, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

4. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 3, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену остатком серина остатка глицина в положении 79;
- б) замену остатком серина остатка пролина в положении 107;
- в) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 419; и
- д) любую их комбинацию.

5. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-4, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E4, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E4.

6. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 5, где последовательность никотиндеметилазы CYP82E4 выбрана из

группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

7. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 5 или 6, где мутация приводит к модификации никотиндеметиلاзы CYP82E4 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 329, 364, 376, 382 и 458, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

8. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 7, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- б) замену остатком аспарагина остатка лизина в положении 364;
- в) замену остатком метионина остатка валина в положении 376;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;
- д) замену остатком серина остатка пролина в положении 458; и
- е) любую их комбинацию.

9. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-8, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E5, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E5.

10. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 9, где последовательность никотиндеметилазы CYP82E5 выбрана из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32.

11. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 9 или 10, где мутация приводит к модификации никотиндеметилазы CYP82E5 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 422 и 449, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

12. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 11, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
- б) замену остатком лейцина остатка пролина в положении 449; и
- в) любую их комбинацию.

13. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 9-12, которое/которая содержит мутацию в гене никотиндеметилазы CYP82E10 и гене никотиндеметилазы CYP82E4.

5 14. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-13, где растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

10 15. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 14, где никотиндеметилаза CYP82E10 содержит мутацию в положении 382, никотиндеметилаза CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и никотиндеметилаза CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

16. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 15, где мутация выбрана из группы, включающей:

- 15 а) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;
б) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
в) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422; и
г) любую их комбинацию.

20 17. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 13-16, где в растении или его части превращается в норникотин меньше 1,5% никотина.

18. Растение или часть растения табака по варианту осуществления изобретения 17, где в растении или его части превращается в норникотин не более 0,5% никотина.

25 19. Семя растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18 или его потомство.

20. Табачное изделие, изготовленное из растения или части растения табака или его потомства по одному из вариантов осуществления изобретения 1-19.

30 21. Способ снижения онкогенного потенциала табачного изделия, заключающийся в том, что приготавливают табачное изделие из растения или части растения табака или его потомства по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18.

22. Способ снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении табака или части растения

табака, заключающийся в том, что интродуцируют в геном растения мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилазы, где мутация снижает экспрессию указанного гена никотиндеметилазы и где первый из указанных генов никотиндеметилазы кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая участвует в метаболитическом превращении никотина в норникотин в растении или части растения табака.

23. Способ по варианту осуществления изобретения 22, в котором специфическая для корня никотиндеметилаза представляет собой никотиндеметилазу CYP82E10, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

24. Способ по варианту осуществления изобретения 23, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E10 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 79, 107, 382, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

25. Способ по варианту осуществления изобретения 24, в котором замена в положении 79, 107, 382 или 419 представляет собой замену на остаток серина.

26. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-25, в котором второй из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E4.

27. Способ по варианту осуществления изобретения 26, в котором никотиндеметилаза CYP82E4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21.

28. Способ по варианту осуществления изобретения 27, в котором
5 аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E4 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 329, 364, 382, 458 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

29. Способ по варианту осуществления изобретения 28, в котором замена
10 представляет собой замену в положении 329 на стоп-кодон, замену в положении 364 на остаток аспарагина, замену в положении 382 на остаток серина, замену в положении 458 на остаток серина или любую их комбинацию.

30. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-29, в
15 котором третий из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E5.

31. Способ по варианту осуществления изобретения 30, в котором никотиндеметилаза CYP82E5 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26,
20 27, 28, 29, 30, 31 или 32; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32.

32. Способ по варианту осуществления изобретения 31, в котором
25 аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E5 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 422 и 449 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

33. Способ по варианту осуществления изобретения 32, в котором замена
30 представляет собой замену в положении 422 на стоп-кодон, замену в положении 449 на остаток лейцина или любую их комбинацию.

34. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-33, в котором растение или часть растения табака является гомозиготным по указанной мутации.

35. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-34, в котором интродукция предусматривает применение протокола селекции.

36. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 22-35, в котором растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

37. Растение или часть растения табака по одному из вариантов осуществления изобретения 1-18, где растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

38. Способ идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, заключающийся в том, что подвергают скринингу образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 1 или 3.

39. Способ по варианту осуществления изобретения 38, в котором растение табака не является конвертером.

40. Способ по варианту осуществления изобретения 38 или 39, в котором скрининг осуществляют с использованием последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, 3, 35, 36, 37 и 38.

41. Способ по одному из вариантов осуществления изобретения 38-40, заключающийся также в том, что подвергают скринингу указанный образец ДНК или другой образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 14, присутствия мутации в SEQ ID NO: 26 или присутствия мутации в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 26.

42. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

б) нуклеотидную последовательность, которая содержит фрагмент, состоящий по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

в) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 97% идентична полной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где полинуклеотид кодирует полипептид, который принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении;

г) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 5-13, или его фрагмент, содержащий по меньшей мере 115 смежных остатков;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, последовательность которого идентична по меньшей мере на 98% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13; и

е) нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности по одному из предыдущих подпунктов (а)-(д).

43. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13;

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13; и

в) аминокислотную последовательность, которая представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, где фрагмент содержит по меньшей мере 115 смежных остатков аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13.

44. Растение или часть растения табака, гомозиготное/гомозиготная по мутации в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E4, и гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E5, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10, CYP82E4 и CYP82E5, где никотиндеметилаза CYP82E10 содержит мутацию в положении 382,

никотиндеметилаза CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и
никотиндеметилаза CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где
нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

45. Мутация в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, где
5 мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы
CYP82E10.

46. Растение, имеющее мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует
активность никотиндеметилазы в корнях, мутацию в гене *CYP82E4v2*, которая
ингибирует активность никотиндеметилазы в стареющих листьях, и мутацию в
10 гене *CYP83E5*, которая ингибирует активность никотиндеметилазы в зеленых
листьях.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1А-В – последовательности ДНК (SEQ ID NO: 4) и предсказанные
15 белковые последовательности гена никотиндеметилазы *CYP82E10*. Кодированные
белок последовательности обозначены прописными буквами, а 5'- и 3'-
фланкирующие последовательности обозначены строчными буквами. Интронная
последовательность (SEQ ID NO: 3) обозначена строчными буквами и выделена
курсивом. Номера нуклеотидных последовательностей представлены слева, а
20 номера белковых последовательностей представлены справа. Нуклеотидные
последовательности, соответствующие ПЦР-праймам, применяемым для
специфической амплификации экзона 1 при скрининге мутаций, подчеркнуты
(не выделены жирным шрифтом), а подчеркнутые последовательности, которые
выделены жирным шрифтом, обозначают сайты специфических для экзона 2
25 праймеров. Индивидуальные нуклеотиды и аминокислотные остатки, которые,
как установлено с помощью скрининга мутаций (таблица 2), можно изменять,
подчеркнуты и выделены жирным шрифтом;

на фиг. 2А-В – сравнительный анализ первичной структуры геномных
последовательностей *CYP82E10* (SEQ ID NO: 4), *CYP82E5v2* (SEQ ID NO: 38) и
30 *CYP82E4v2* (SEQ ID NO: 37). Кодированные белок последовательности
обозначены прописными буквами; 5'- и 3'-нетранслируемые области обозначены
строчными буквами; а интронные последовательности обозначены строчными

буквами и курсивом. Идентичные положения в последовательностях обозначены затемненными прямоугольниками;

на фиг. 3 – данные, полученные с помощью тонкослойной хроматографии, об активности никотиндеметилазы микросомальных мембран из клеток дрожжей, которые экспрессируют CYP82E10 и несущую мутацию Ser382Pro (S382P) CYP82E10, которая получена из растения 1041. СPM обозначает число импульсов в мин;

на фиг. 4А и 4Б – средний процент превращения никотина в растениях табака сорта Бёрли, несущих различные комбинации мутаций в локусах CYP82E4v2, CYP82E5v2 и CYP82E10. Средние значения, обозначенные различными буквами, обозначают достоверные различия с уровнем $P < 0,05$.

Описание последовательностей, входящих в перечень последовательностей

Ниже представлена информация о последовательностях, входящих в перечень последовательностей. Использовали стандартное обозначение аминокислотных замен. Так, например, CYP82E10 P419S обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток серина в положении 419, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E10, которая представлена в SEQ ID NO: 2. В качестве другого примера: CYP82E4 P38L обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток лейцина в положении 38, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E4, которая представлена в SEQ ID NO: 14. И в качестве еще одного примера: CYP82E5 P72L обозначает вариант белка, в котором остаток пролина заменен на остаток лейцина в положении 72, где нумерация соответствует последовательности дикого типа, в данном случае последовательности CYP82E5, которая представлена в SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 1 соответствует кодирующей последовательности CYP82E10.

SEQ ID NO: 2 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E10.

SEQ ID NO: 3 соответствует нуклеотидной последовательности интрона CYP82E10.

SEQ ID NO: 4 соответствует геномной последовательности CYP82E10.

SEQ ID NO: 5 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 L148F.

SEQ ID NO: 6 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 G172R.

5 SEQ ID NO: 7 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 A344T.

SEQ ID NO: 8 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 A410T.

10 SEQ ID NO: 9 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 R417H.

SEQ ID NO: 10 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 P419S.

SEQ ID NO: 11 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 G79S.

15 SEQ ID NO: 12 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 P107S.

SEQ ID NO: 13 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E10 P382S.

20 SEQ ID NO: 14 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4.

SEQ ID NO: 15 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 P38L.

SEQ ID NO: 16 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 D171N.

25 SEQ ID NO: 17 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 E201K.

SEQ ID NO: 18 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 R169Q.

30 SEQ ID NO: 19 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 G459R.

SEQ ID NO: 20 соответствует аминокислотной последовательности
CYP82E4 T427I.

SEQ ID NO: 21 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 V376M.

SEQ ID NO: 22 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 W329Stop.

5 SEQ ID NO: 23 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 K364N.

SEQ ID NO: 24 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 P382S.

10 SEQ ID NO: 25 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E4 P458S.

SEQ ID NO: 26 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5.

SEQ ID NO: 27 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P72L.

15 SEQ ID NO: 28 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 L143F.

SEQ ID NO: 29 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 S174L.

20 SEQ ID NO: 30 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 M224I.

SEQ ID NO: 31 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P235S.

SEQ ID NO: 32 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 A410V.

25 SEQ ID NO: 33 s соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 W422Stop.

SEQ ID NO: 34 соответствует аминокислотной последовательности CYP82E5 P449L.

30 SEQ ID NO: 35 соответствует последовательности «прямого» праймера экзона 1 *CYP82E10*.

SEQ ID NO: 36 соответствует последовательности «обратного» праймера экзона 1 *CYP82E10*.

SEQ ID NO: 37 соответствует последовательности «прямого» праймера экзона 2 *CYP82E10*.

SEQ ID NO: 37 соответствует последовательности «обратного» праймера экзона 2 *CYP82E10*.

5 SEQ ID NO: 38 соответствует геномной последовательности *CYP82E4v2*.

SEQ ID NO: 39 соответствует геномной последовательности *CYP82E5v2*.

Определения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, предназначенным для ингибирования экспрессии или функции специфических для корня полипептидов никотиндеметилазы, которая принимает участие в метаболитическом превращении никотина в норникотин в корнях растения, прежде всего растений рода *Nicotiana*, включая растения табака различных коммерческих сортов.

В контексте настоящего описания понятия «ингибировать», «ингибирование», «ингибирующий» относятся к снижению экспрессии или функции представляющего интерес генного продукта (т.е. генного продукта-мишени), в данном случае никотиндеметилазы, такой как специфическая для корня никотиндеметилаза, предлагаемая в изобретении, что оценивают с помощью любого метода, известного в данной области, или представленного в настоящем описании. Установлено, что полипептиды никотиндеметилазы можно ингибировать с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области, включая смысловое и антисмысловое подавление, подавление на основе РНКi, подходы, предусматривающие «выключение», такие как мутагенез, и т.п. Наиболее предпочтительными являются методы, приводящие к «выключению» или частичному подавлению («замалчиванию») экспрессии и/или функции указанных специфических для корня никотиндеметилаз, прежде всего подходы на основе мутагенеза, которые позволяют осуществлять селекцию в отношении предпочтительных мутаций в гене *CYP82E10* никотиндеметилазы.

Под «предпочтительной мутацией» подразумевают мутацию, которая приводит к замене, инсерции, делеции или укорочению полипептида *CYP82E10*, в результате чего ингибируется его никотиндеметилазная активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения никотиндеметилазная активность ингибируется по меньшей мере на 25%, 30%, 35, 40%, 45, 50%, 55%

или 60% по сравнению с активностью полипептида СУР82Е10 дикого типа в одинаковых условиях тестирования. В других вариантах осуществления изобретения никотиндеметилазная активность ингибируется по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения предпочтительная мутация обеспечивает полное ингибирование (т.е. 100%-ное ингибирование), и никотиндеметилазная активность является «выключенной» (т.е. уровень активности находится ниже предела измерения).

«Ингибирование» можно рассматривать с позиций сравнения между двумя растениями, например, генетически измененного растения и растения дикого типа. Можно осуществлять сравнение между растениями, например, растением дикого типа и растением, в котором отсутствует последовательность ДНК, обладающая способностью продуцировать специфическую для корня никотиндеметилазу, которая превращает никотин в норникотин. Ингибирование экспрессии или функции генного продукта-мишени можно рассматривать также с позиций сравнения между растительными клетками, органеллами, органами, тканями или частями растения, присутствующими в одном и том же растении, или между различными растениями, и это понятие включает сравнение между стадиями развития или ограниченными временем стадиями развития одного и того же растения или части растения или между растениями или частями растений.

«Ингибирование» может включать любое относительное уменьшение функции или производства представляющего интерес генного продукта, в данном случае специфической для корня никотиндеметилазы, вплоть до и включительно полного элиминирования функции или производства указанного генного продукта. При сравнении уровней генного продукта указанное сравнение предпочтительно осуществляют между организмами со сходным генетическим фоном. Предпочтительно сходный генетический фон представляет собой фон, при котором для организмов характерна идентичность последовательностей ядерного генетического материала, составляющая 50% или более, более предпочтительно 75% или более и еще более предпочтительно 90% или более. Сходный генетический фон представляет собой фон, при котором, если сравниваемые организмы представляют собой растения, растения являются

изогенными за исключением любого генетического материала, первоначально интродуцированного с помощью методов трансформации растений или с помощью мутации, созданной благодаря вмешательству человека. Оценку уровня или количества генного продукта можно осуществлять с помощью
5 любого приемлемого метода, примерами которого являются (но, не ограничиваясь только ими) сравнение уровней мРНК-транскриптов, уровней белков или пептидов и/или фенотипа, прежде всего касательно превращения никотина в норникотин. В контексте настоящего описания мРНК-транскрипты могут представлять собой процессированные и неprocessированные мРНК-
10 транскрипты, а полипептиды или пептиды могут представлять собой полипептиды или пептиды, которые имеют какую-либо пост-трансляционную модификацию или не имеют ее.

В контексте настоящего описания «вариант» означает практически сходную последовательность. Вариант может обладать другой функцией или
15 практически сходной функцией с представляющим интерес полипептидом дикого типа. Касательно никотиндеметилазы практически сходная функцию представляет собой функцию, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 60%, 50%, 25% или 15% соответствует свойственной ферменту дикого типа функции по превращению никотина в норникотин в таких
20 же условиях или в практически изогенной линии. Последовательность CYP82E10 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 2. Последовательность CYP82E4 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 14. Последовательность CYP82E5 дикого типа представлена в SEQ ID NO: 26. Примеры вариантов CYP82E10 дикого типа, предлагаемые в настоящем изобретении, включают
25 полипептиды, которые содержат последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 10 (CYP82E10 P419S), является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является то, что фермент обладает только примерно 25% никотиндеметилазной активности полипептида
30 CYP82E10 дикого типа. Особенностью вариантов, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11 (CYP82E10 G79S), SEQ ID NO: 12 (CYP82E10 с P107S) и SEQ ID NO: 13 (CYP82E10 с P382S), является наличие предпочтительных мутаций, результатом которых является «выключение» их

никотиндеметиلاзной активности (т.е. 100% ингибирование, приводящее к получению нефункционального полипептида). Аналогично этому, примерами вариантов CYP82E4 дикого типа являются полипептиды, которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 21 (CYP82E4 V376M), является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является то, что фермент обладает только примерно 50% никотиндеметиلاзной активности полипептида CYP82E4 дикого типа. Особенностью вариантов, последовательность которых представлена в SEQ ID NO: 22 (CYP82E4 W329Stop), SEQ ID NO: 23 (CYP82E4 K364N), SEQ ID NO: 24 (CYP82E4 P382S) и SEQ ID NO: 25 (CYP82E4 P458S), является наличие предпочтительных мутаций, результатом которых является «выключение» их никотиндеметилазной активности (т.е. 100% ингибирование). Аналогично этому, примерами вариантов CYP82E5 дикого типа являются полипептиды, которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34. Особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 34 (CYP82E5 P449L), является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является ингибирование его никотиндеметилазной активности, а особенностью варианта, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 33, является наличие предпочтительной мутации, результатом которой является «выключение» его никотиндеметилазной активности (т.е. 100% ингибирование).

В контексте настоящего описания «вариант полинуклеотида» или «вариант полипептида» означает, что нуклеотидная или аминокислотная последовательность не представляет собой последовательность дикого типа.

Вариант может иметь одно/одну добавление, делецию или замену; два или меньшее количество добавлений, делеций или замен; три или меньшее количество добавлений, делеций или замен; четыре или меньшее количество добавлений, делеций или замен; или пять или меньшее количество добавлений, делеций или замен. Мутация может приводить к добавлениям, делециям и заменам. Указанные делеции или добавления могут затрагивать С-конец, N-конец или и С-, и N-концы. Под объем настоящего изобретения подпадают также слитые полипептиды или меченные эпитопом полипептиды. «Молчашие»

мутации нуклеотидов не изменяют кодируемую аминокислоту в данном положении. Аминокислотные замены могут быть консервативными. Консервативная замена представляет собой замену аминокислоты на аминокислоту из такого же семейства аминокислот, что и исходная

5 аминокислота. Семейство определяется боковой цепью индивидуальных аминокислот. Семейство аминокислот может иметь основные, кислотные, незаряженные полярные или неполярные боковые цепи (см. Alberts и др., Molecular biology of the cell, 3-е изд., изд-во Garland Publishing Inc., New York, New York, 1994, сс. 56-57), публикация полностью включена в настоящее

10 описание в качестве ссылки). Делеция, замена или добавление может затрагивать аминокислоту другого представителя семейства CYP82E в этом положении. В контексте настоящего описания «фрагмент» означает часть полинуклеотида или часть полипептида и, следовательно, кодируемого белка.

В контексте настоящего описания понятие «часть растения» обозначает

15 клетки растения, протопласты растения, культуры тканей, клеток растения, из которых можно регенерировать целое растение, каллусы растения, маточные корневища растения и клетки растения, которые являются интактными в растениях или частях растений, такие как зародыши, пыльца, пыльниковые мешки, семяпочки, семена, листья, цветки, стебли, ветви, плоды, корни,

20 верхушечные корни и т.п. Под объем настоящего изобретения подпадают также потомство, варианты и мутанты регенерированных растений, при условии, что они содержат интродуцированные полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении. В контексте настоящего описания понятие «материал растения табака» обозначает любую составляющую часть растения или любые

25 комбинации частей растения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новому гену никотиндеметилазы, CYP82E10 (геномная последовательность представлена в SEQ ID NO: 4), и к кодируемой им никотиндеметилазе CYP82E10 (SEQ ID NO: 2), которая

30 участвует в специфическом для корня превращении никотина в норникотин в корнях растений табака, и к их применению для снижения или минимизации превращения никотина в норникотин и, как следствие, к снижению уровней норникотина в растениях и частях растений табака. Под «специфической для

корня» подразумевается экспрессия, происходящая главным образом в корнях растений табака, в отличие от других органов растения, таких как листья или семена. Путем интродукции отобранных предпочтительных мутаций в указанную специфическую для корня никотиндеметиразу или ее варианты, 5 которые обладают никотиндеметиразной активностью, в сочетании с интродукцией одной или нескольких отобранных предпочтительных мутаций в ген, который кодирует присутствующую в зеленых листьях никотиндеметиразу (например, CYP82E5, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 26) или ее вариант, который обладает никотиндеметиразной активностью, а 10 также в сочетании с интродукцией одной или нескольких отобранных предпочтительных мутаций в ген, который кодирует индуцируемую старением никотиндеметиразу (например, CYP82E4, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 14) или ее вариант, который обладает никотиндеметиразной активностью, можно получать нетрансгенные растения 15 табака, которые отличаются минимальным превращением никотина в норникотин, в которых уровень превращения составляет менее примерно 1,5%, предпочтительно менее примерно 1%.

Пониженные уровни норникотина в табаке являются очень желательными, поскольку этот алкалоид служит предшественником хорошо известного 20 карциногена N'-нитрозонорникотина (NNN). Два гена, которые кодируют белки, обладающие никотиндеметиразной активностью в табаке, были ранее идентифицированы и обозначены как *CYP82E4v2* и *CYP82E5v2*. Полипептид CYP82E4 (SEQ ID NO: 14) представляет собой индуцируемую старением никотиндеметиразу. Ген *CYP82E4v2* (включающий кодирующую и интронную 25 области), его роль в производстве норникотина в растениях табака и методы ингибирования его экспрессии и функции описаны в заявке на патент США № 11/580765, которая опубликована в виде публикации заявки на патент США № 2008/0202541 A1. Полипептид CYP82E5 (SEQ ID NO: 26) представляет собой присутствующую в зеленых листьях никотиндеметиразу (т.е. экспрессия которой 30 главным образом происходит в зеленых листьях). Ген *CYP82E4* (включающий кодирующую и интронную области), его роль в производстве норникотина в растениях табака и методы ингибирования его экспрессии и функции описаны в заявке на патент США № 12/269531, , которая опубликована в виде публикации

заявки на патент США № 2009/0205072 A1. Содержание двух указанных заявок на патент США и соответствующие их публикации полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Однако, растения, гомозиготные по предпочтительным мутантным аллелям *сур82е4v2* и *сур82е5v2* (т.е. мутантные аллели, которые обеспечивают «замалчивание» или «выключение» экспрессии указанных соответствующих генов никотиндеметилазы), все еще могут метаболизировать более 2% присутствующего в них никотина в норникотин, т.е. приводить к получению уровней норникотина, которые все еще могут приводить к заметному образованию NNN. Открытие гена *СУР82Е10* никотиндеметилазы представляет собой дополнительный путь минимизации уровня превращения никотина в норникотин в растениях табака и таким образом дополнительного снижения уровней норникотина и, следовательно NNN, в растениях табака и полученных из них растительных материалах. Объединение предпочтительных мутантных аллелей *сур82е10* с предпочтительными мутантными аллелями *сур82е4v2* и *сур82е5v2* позволяет получать растения табака, отличающиеся снижением более чем в 3 раза уровня норникотина по сравнению с растениями табака, которые несут только мутацию *сур82е4v2* или в сочетании с мутацией *сур82е5v2*. Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения являются гены никотиндеметилазы, гомозиготные по комбинации трех мутантов (*сур82е4v2*, *сур82е5v2* и *сур82е10*), которые позволяют получать нетрансгенные растения табака, в которых продуцируются очень низкие уровни норникотина по сравнению с уровнями, которые ранее были достигнуты на основе подходов подавления с помощью трансгенов, например, описанных в публикациях заявок на патент США №№ 2008/0202541 A1 и 2009/0205072 A1.

Полинуклеотиды и полипептиды никотиндеметилаз и их варианты и фрагменты

Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, включают полипептид СУР82Е10 и его варианты и фрагменты. Указанные полинуклеотиды и полипептиды никотиндеметилаз участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, включая коммерческие сорта растений табака. В частности, композиции, предлагаемые в изобретении, включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, которые

представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13, выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, которые представлены в SEQ ID NO: 1, 3 и 4, и выделенные полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности, которые представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13.

- 5 Полинуклеотиды, предлагаемые в настоящем изобретении, могут найти применение для ингибирования экспрессии полипептидов никотиндеметилаз или их вариантов, которые принимают участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, в частности, в растениях табака. Некоторые полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, имеют мутации, которые
- 10 приводят к ингибированию никотиндеметилазной активности никотиндеметилазы дикого типа. Ингибирование полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, эффективно снижает уровни норникотина в линиях табака, при этом конверсия гена встречается у менее чем 30%, 50%, 70%, 90% популяции, такой как предназначенные для сушки на пару сорта табака.
- 15 Ингибирование полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, эффективно снижает уровни норникотина в популяциях растений табака, в которых конверсия гена встречается по меньшей мере у 90%, 80%, 70%, 60%, 50% популяции растений. В популяции предпочтительно присутствует более
- 20 примерно 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 25000 растений, при этом более предпочтительно по меньшей мере примерно 10%, 25%, 50%, 75%, 95% или 100% растений содержат полипептид, предлагаемый в настоящем изобретении.

Полинуклеотиды никотиндеметилаз и кодируемые ими полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, включают новый ген цитохрома P450, обозначенный как ген *CYP82E10* никотиндеметилазы, для которого впервые

25 установлена роль в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений табака. Трансгенные подходы, такие как смысловое и антисмысловое подавление и подавление на основе РНКi, можно применять для частичного подавления экспрессии указанной никотиндеметилазы, таким же

30 образом, как это описано для никотиндеметилаз *CYP82E4* и *CYP82E5* в публикациях заявок на патент США № 2008/0202541 A1 и № 2009/0205072 A1, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Предпочтительный подход основан на интродукции одной или нескольких предпочтительных мутаций в указанный ген, поскольку

преимуществом этого подхода является получение нетрансгенных растений табака, имеющих пониженные уровни превращения никотина в норникотин и в результате пониженные уровни норникотина и NNN. Указанные подходы включают (но, не ограничиваясь только ими) мутагенез и т.п., как это будет описано ниже.

Изобретение относится к композициям, предлагаемым в настоящем изобретении, которые содержат выделенные или практически очищенные полинуклеотиды или белки. «Выделенный» или «очищенный» полинуклеотид или белок или их биологически активный фрагмент представляет собой субстанцию, практически или в значительной степени очищенную от компонентов, которые в норме сопутствуют или взаимодействуют с полинуклеотидом или белком в их естественном окружении. Таким образом, выделенный или очищенный полинуклеотид или белок является практически свободным от другого клеточного материала или культуральной среды при получении с помощью методов рекомбинации или практически свободным от химических предшественников или других химических соединений при получении путем химического синтеза. В оптимальном варианте «выделенный» полинуклеотид свободен от последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белок), которые в естественных условиях фланкируют полинуклеотид (т.е. последовательностей, локализованных на 5'- и 3'-концах полинуклеотида) в геномной ДНК организма, из которого получен полинуклеотид. Например, в различных вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность длиной менее чем примерно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1 т.п.н., которая в естественных условиях фланкирует полинуклеотид в геномной ДНК клетки, из которой получен полинуклеотид. Белок, практически свободный от клеточного материала, включает препараты белка, содержащие загрязняющий белок в количестве менее чем примерно 30%, 20%, 10%, 5% или 1% (в пересчете на сухую массу). Когда белок, предлагаемый в изобретении, или его биологически активный фрагмент получают методом рекомбинации, то предпочтительно культуральная среда содержит химические предшественники или не представляющие интерес небелковые соединения в количестве, составляющем менее чем примерно 30% 20%, 10%, 5% или 1% (в пересчете на сухую массу).

Под объем настоящего изобретения подпадают также фрагменты описанных полинуклеотидов и кодируемых ими полипептидов. Фрагменты полинуклеотида могут кодировать белковые фрагменты, который сохраняют биологическую активность нативного белка и поэтому участвуют в

5 метаболическом превращении никотина в норникотин в растении. В альтернативном варианте фрагменты полинуклеотида, которые можно применять в качестве зондов для гибридизации или ПЦР-праймеров, как правило, не кодируют белковые фрагменты, сохраняющие биологическую

10 активность. Кроме того, фрагменты описанных нуклеотидных последовательностей включают фрагменты, которые можно собирать в рекомбинантных конструкциях, предназначенных для «замалчивания» гена с помощью любого метода, известного в данной области, включая (но, не ограничиваясь только ими) смысловое подавление/косупрессию, антисмысловое

15 подавление, интерференцию с использованием двухцепочечной РНК (dsРНК), интерференцию с использованием шпилечной РНК и интерференцию с использованием содержащей интрон шпилечной РНК, опосредуемую ампликоном интерференцию, рибозимы и методы с использованием малых

20 интерферирующих РНК или микроРНК, известные в данной области и описанные ниже. Таким образом, в зависимости от требуемой цели фрагменты нуклеотидной последовательности могут состоять из по меньшей мере примерно

25 20 нуклеотидов, примерно 50 нуклеотидов, примерно 70 нуклеотидов, примерно 100 нуклеотидов, примерно 150 нуклеотидов, примерно 200 нуклеотидов, 250 нуклеотидов, 300 нуклеотидов и иметь длину вплоть до длины полноразмерного полинуклеотида, кодирующего белки, предлагаемые в изобретении. В одном из

30 объектов изобретения фрагменты нуклеотидной последовательности могут представлять собой фрагмент, включающий от 100 до примерно 350 нуклеотидов, от 100 до примерно 325 нуклеотидов, от 100 до примерно 300 нуклеотидов, от примерно 125 до примерно 300 нуклеотидов, от примерно 125 до примерно 275 нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 320 смежных

35 нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 420 смежных нуклеотидов, от примерно 250 до примерно 450 смежных нуклеотидов. В другом варианте осуществления изобретения молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит от примерно 300 до примерно 450 смежных нуклеотидов.

Фрагмент полинуклеотида никотиндеметилазы, предлагаемый в настоящем изобретении, который кодирует биологически активный фрагмент полипептида СУР82Е10, предлагаемого в настоящем изобретении, может кодировать по меньшей мере 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 смежных аминокислот, или вплоть до полного количества аминокислот, присутствующих в полноразмерном полипептиде никотиндеметилазы, предлагаемой в изобретении (например, 517 аминокислот в случае SEQ ID NO: 2 и 5-13). Биологически активный фрагмент полипептида никотиндеметилазы можно получать путем выделения части одного из полинуклеотидов СУР82Е10, предлагаемых в настоящем изобретении, экспрессии кодируемого фрагмента полипептида СУР82Е10 (например, путем рекомбинантной экспрессии *in vitro*) и оценки активности кодируемого фрагмента полипептида СУР82Е10, т.е. способности усиливать превращение никотина в норникотин, с помощью анализов, известных в данной области и представленных ниже в настоящем описании.

Полинуклеотиды, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности СУР82Е10, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат по меньшей мере 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650 или 1700 смежных нуклеотидов, или вплоть до количества нуклеотидов, присутствующих в полноразмерном полинуклеотиде СУР82Е10, представленном в настоящем описании (например, 1551 в случае SEQ ID NO: 1; 2636 в случае SEQ ID NO: 4). Полинуклеотиды, которые представляют собой фрагменты нуклеотидной последовательности СУР82Е10, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат фрагменты, содержащие от примерно 20 до примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 50 до примерно 1600 смежных нуклеотидов, от примерно 75 до примерно 1500 смежных нуклеотидов, от примерно 100 до примерно 1400 нуклеотидов, от примерно 150 до примерно 1300 смежных нуклеотидов, от примерно 150 до примерно 1200 смежных нуклеотидов, от примерно 175 до примерно 1100 смежных нуклеотидов, от примерно 200 до примерно 1000 смежных нуклеотидов, от примерно 225 до примерно 900 смежных нуклеотидов, от примерно 500 до примерно 1600 смежных нуклеотидов, от примерно 775 до

примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 1000 до примерно 1700 смежных нуклеотидов, от примерно 300 до примерно 800 смежных нуклеотидов из полинуклеотида СУР82Е10, представленного в настоящем описании. В одном из объектов изобретения фрагменты полинуклеотидов содержат

5 полинуклеотидную последовательность, включающую полинуклеотидную последовательность, которая начинается с нуклеотида примерно в положении 700 и простирается примерно до положения 1250 кодирующей последовательности СУР82Е10, которая начинается с нуклеотида примерно в положении 700 и простирается примерно до положения 1250 геномной последовательности СУР82Е10, которая начинается с нуклеотида примерно в
10 положении 10 и простирается примерно до положения 900 интронной последовательности СУР82Е10 или которая начинается с нуклеотида примерно в положении 100 и простирается примерно до положения 800 интронной последовательности СУР82Е10.

15 Под объем настоящего изобретения подпадают также варианты описанных полинуклеотидов и кодируемых ими полипептидов. К встречающимся в естественных условиях вариантам относятся варианты, последовательности которых практически идентичны последовательностям полинуклеотидов и полипептидов СУР82Е10, представленных ниже в настоящем описании. В
20 другом варианте осуществления изобретения встречающиеся в естественных условиях варианты функционально практически идентичны полинуклеотидам СУР82Е10, представленным в настоящем описании. Композиции и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для целенаправленного воздействия на экспрессию или функцию встречающегося в естественных
25 условиях СУР82Е10, последовательность которого практически идентична последовательности описанных полипептидов СУР82Е10. Указанные полипептиды СУР82Е10 могут обладать соответствующей никотиндеметилазной активностью, т.е. принимать участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, или не обладать указанной активностью. Такие
30 варианты могут возникать, например, в результате генетического полиморфизма или человеческого воздействия, что имеет место при разведении и селекции, в том числе при использовании основанных на применении мутагенеза подходов. Последовательности биологически активных вариантов белка СУР82Е10,

предлагаемого в изобретении, например, вариантов полипептида, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2 и 5-13, должны быть идентичны по меньшей мере примерно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более аминокислотной последовательности белка дикого типа при оценке с помощью программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые указаны ниже в настоящем описании, и они могут быть охарактеризованы по их функции, включающей участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растениях, или по отсутствию указанной функции. Биологически активный вариант белка, предлагаемого в изобретении, может отличаться от белка как минимум 1-15 аминокислотными остатками, как минимум 10, как минимум 9, как минимум 8, как минимум 7, как минимум 6, как минимум 5, как минимум 4, как минимум 3, как минимум 2 или как минимум 1 аминокислотным остатком. Биологически неактивный вариант белка, предлагаемого в изобретении, может отличаться от белка как минимум 1-15 аминокислотными остатками, как минимум 10, как минимум 9, как минимум 8, как минимум 7, как минимум 6, как минимум 5, как минимум 4, как минимум 3, как минимум 2 или как минимум 1 аминокислотным остатком.

Варианты конкретного полинуклеотида, предлагаемого в настоящем изобретении, включают встречающиеся в естественных условиях полинуклеотиды, которые кодируют полипептид СУР82Е10, принимающий участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях растений. Указанные варианты полинуклеотида могут отличаться делецией и/или добавлением одного или несколько нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде, представленном в настоящем описании, и/или заменой одного или несколько нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде. В результате вырожденности генетического кода консервативные варианты полинуклеотидов включают последовательности, которые кодируют аминокислотную последовательность одного из полипептидов СУР82Е10, предлагаемых в изобретении. Встречающиеся в естественных условиях варианты, такие как указанные выше, можно идентифицировать с помощью хорошо известных методов молекулярной биологии, таких, например, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методы

гибридизации, хорошо известные в данной области и представленные в настоящем описании. Варианты полинуклеотидов включают также полученные синтетическим путем полинуклеотиды, например, полученные с помощью сайтнаправленного мутагенеза, но последовательности которых все еще являются практически идентичными встречающимся в естественных условиях последовательностям, представленным в настоящем описании, и которые в результате можно применять в способах, предлагаемых в изобретении, предназначенных для ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилазы, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин, включая полипептиды никотиндеметилазы, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. Как правило, последовательности вариантов конкретного полинуклеотида, предлагаемого в изобретении, например, полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, или полинуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 и 5-13, должны быть идентичны по меньшей мере примерно на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности конкретного полинуклеотида при оценке с помощью программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые указаны ниже в настоящем описании.

Варианты конкретного полинуклеотида, предлагаемого в настоящем изобретении (обозначенного также в контексте настоящего описания как референс-полинуклеотид) можно оценивать также путем сравнения идентичности последовательности полипептида, кодируемого референс-полинуклеотидом, и полипептида, кодируемого вариантом полинуклеотида. Процент идентичности между любыми двумя полипептидами можно рассчитывать с использованием программ сравнительного анализа первичной структуры последовательностей и параметров, которые описаны ниже в контексте настоящего описания. Когда любую конкретную пару полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении, оценивают путем сравнения процента идентичности последовательностей, характерного для двух кодируемых ими полипептидов, процент идентичности последовательностей

двух кодируемых полипептидов составляет по меньшей мере примерно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

Кроме того, полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, можно
5 применять для выделения соответствующих последовательностей
специфических для корня никотиндеметилаз, прежде всего последовательностей
СУР82Е10, из других представителей рода *Nicotiana*. ПЦР, гибридизацию и
другие аналогичные методы можно применять для идентификации указанных
последовательностей на основе гомологии этих последовательностей и
10 последовательностей, представленных в настоящем описании. Под объем
настоящего изобретения подпадают последовательности, выделенные на основе
идентичности их последовательностей с нуклеотидными последовательностями,
представленными в настоящем описании, или с их вариантами или фрагментами.
Указанные последовательности включают последовательности, которые
15 являются ортологами описанных последовательностей.

Согласно настоящему изобретению «ортологами» являются гены,
выведенные из общего родового гена и которые присутствуют в различных
видах в результате специализации. Гены, обнаруженные в различных видах,
рассматриваются как ортологи, когда для их нуклеотидных последовательностей
20 и/или кодируемых белковых последовательностей характерна идентичность,
составляющая по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,
94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Функции ортологов часто являются
высококонсервативными в различных видах. Таким образом, под объем
настоящего изобретения подпадают выделенные полинуклеотиды, которые
25 кодируют полипептид никотиндеметилазы, участвующей в метаболическом
превращении никотина в норникотин, и которые гибридизуются в строгих
условиях с последовательностью СУР82Е10, представленной в настоящем
описании, или с ее вариантами или фрагментами. Указанные
последовательности можно применять в способах, предлагаемых в настоящем
30 изобретении, ингибирования экспрессии полипептидов никотиндеметилаз,
которые участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в
растениях.

С помощью ПЦР можно создавать олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для применения в ПЦР-реакциях для амплификации соответствующих последовательностей ДНК с кДНК или геномной ДНК, экстрагированной из любого представляющего интерес растения. Методы создания ПЦР-праймеров и ПЦР-клонирования, в целом, известны в данной области и описаны у Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989; в: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* под ред. Innis и др., изд-во Academic Press, New York, 1990; в: *PCR Strategies*, под ред. Innis и Gelfand, изд-во Academic Press, New York, 1995; и в: *PCR Methods Manual*, под ред. Innis и Gelfand, изд-во Academic Press, New York, 1999. Известные методы осуществления ПЦР включают (но, не ограничиваясь только ими) методы, основанные на использовании пар праймеров, гнездовых праймеров, односпецифических праймеров, вырожденных праймеров, генспецифических праймеров, векторспецифических праймеров, в частности, не обеспечивающих строгое соответствие («приблизительных») праймеров и т.п.

Методы гибридизации включают применение всего или части известного полинуклеотида в качестве зонда, который избирательно гибридизуется с другими соответствующими полинуклеотидами, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментов кДНК (т.е. библиотеки геномной ДНК или кДНК) из выбранного организма.

Гибридизацию можно осуществлять в строгих условиях. Под «строгими условиями» или «строгими условиями гибридизации» понимают условия, при которых зонд гибридизуется с его последовательностью-мишенью в значительно большей степени, чем с другими последовательностями (например, с уровнем гибридизации, превышающим фоновый уровень по меньшей мере в 2 раза). Строгие условия зависят от последовательности и должны быть разными в различных ситуациях. Контролируя строгость условий гибридизации и/или отмывки, можно идентифицировать последовательности-мишени, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). В альтернативном варианте строгие условия можно регулировать таким образом, чтобы допускать наличие нескольких мисмэтчей в последовательностях, в результате чего наблюдается более низкая степень сходства (гетерологичное зондирование). Как

правило, зонд содержит менее примерно 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, строгие условия представляют собой условия, при которых концентрация соли составляет менее примерно 1,5М в пересчете на ионы Na, как правило, концентрация составляет примерно от 0,01 до 1,0М в пересчете на ионы Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и при температуре, составляющей по меньшей мере примерно 30°C. Для достижения строгих условий можно также добавлять дестабилизирующие агенты, такие как формамид. Примером гибридизации в условиях пониженной строгости является гибридизации с использованием буферного раствора, содержащего от 30 до 35% формамида, 1М NaCl, 1% ДСН (додецилсульфат натрия), при 37°C и отмывки в 1-2× SSC (20× SSC = 3,0М NaCl/0,3М тринатрийцитрат) при 50-55°C. Примером гибридизации в условиях умеренной строгости является гибридизация с использованием от 40 до 45% формамида, 1,0М NaCl, 1% ДСН при 37°C и отмывки в 0,5-1× SSC при 50-60°C. Примером гибридизации в строгих условиях является гибридизации с использованием 5% формамида, 1М NaCl, 1% ДСН при 37°C и отмывки в 0,1× SSC при 60-65°C. Необязательно буфер для отмывки может содержать от примерно 0,1% до примерно 1% ДСН. Продолжительность гибридизации, как правило, составляет менее чем примерно 24 ч, как правило, от примерно 4 до примерно 12 ч. Продолжительность отмывки должна быть по меньшей мере достаточной для достижения равновесия.

В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридизация в строгих условиях представляет собой гибридизацию в растворе, содержащем 5×SSC, 0,5% ДСН, 5× раствор Денхарда, 0,45 мкг/мкл полиА-РНК, 0,45 мкг/мл ДНК тимуса телят и 50% формамида, при 42°C и с использованием по меньшей мере одной отмывки после гибридизации в растворе, содержащем от примерно 0,01× SSC до примерно 1× SSC. Продолжительность гибридизации составляет от примерно 14 до примерно 16 ч.

Специфичность, как правило, зависит от условий отмывок после гибридизации, при этом имеющими решающее значение факторами являются ионная сила и температура конечного отмывочного раствора. Для гибридов типа ДНК-ДНК $t_{пл}$ можно аппроксимировать из уравнения, указанного у Meinkoth и Wahl, Anal. Biochem. 138, 1984, сс. 267-284: $t_{пл} = 81,5°C + 16,6 (\log M) + 0,41$

(%GC) – 0,61 (% form) - 500/L; в котором M обозначает молярность
одновалентных катионов, %GC обозначает процентное содержание
гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК, % form обозначает
процентное содержание формамида в растворе для гибридизации и L обозначает
5 длину гибрида в парах оснований. $t_{пл}$ представляет собой температуру (при
определенной ионной силе и значении pH), при которой 50% комплементарной
последовательности-мишени гибридизуется с точно соответствующим зондом.
 $t_{пл}$ снижается примерно на 1°C при наличии каждого 1% мисмэтчей; таким
образом, $t_{пл}$, условия гибридизации и/или отмывки можно регулировать для
10 гибридизации с последовательностями требуемой идентичности. Например, если
требуется последовательности с идентичностью >90%, то $t_{пл}$ можно снижать на
10°C. Как правило, строгие условия выбирают, используя температуру примерно
на 5°C ниже, чем термическая точка плавления ($t_{пл}$) конкретной
последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и
15 значении pH. Однако при применении строгих условий гибридизацию и/или
отмывку можно осуществлять при температуре, которая на 1, 2, 3 или 4°C ниже
термической точки плавления ($t_{пл}$); при применении умеренных условий
гибридизацию и/или отмывку можно осуществлять при температуре, которая на
6, 7, 8, 9 или 4°C ниже термической точки плавления ($t_{пл}$); при применении
20 расслабленных условий гибридизацию и/или отмывку можно осуществлять при
температуре, которая на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже термической точки
плавления ($t_{пл}$). Обычному специалисту в данной области должно быть
очевидно, что при использовании указанного уравнения, составов для
гибридизации и отмывки и требуемой $t_{пл}$, можно изменять строгость растворов
25 для гибридизации и/или отмывки. Если допустимый уровень мисмэтчей
приводит к тому, что $t_{пл}$ составляет менее 45°C (водный раствор) или 32° C
(раствор формамида), то предпочтительно повышать концентрацию SSC для
того, чтобы применять более высокую температуру. Подробное руководство по
гибридизации нуклеиновых кислот представлено у Tijssen, Laboratory Techniques
30 in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid
Probes, часть I, глава 2, изд-во Elsevier, New York, 1993; и в Current Protocols in
Molecular Biology, под ред. Ausubel и др., глава 2, изд-во Greene Publishing and

Wiley-Interscience, New York, 1995 (см. Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-ое изд, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989).

5 Применяемые для гибридизации зонды могут представлять собой
фрагменты геномной ДНК, кДНК-фрагменты, РНК-фрагменты или другие
олигонуклеотиды и могут быть мечены выявляемой группой, такой как ^{32}P или
другой выявляемый маркер. Например, зонды для гибридизации можно
создавать путем мечения синтетических олигонуклеотидов, основной которых
являются полинуклеотидные последовательности СУР82Е10, предлагаемые в
10 настоящем изобретении. Методы получения зондов для гибридизации и
конструирования библиотек кДНК и геномных ДНК, в целом, известны в данной
области и описаны у Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-
ое изд, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989.

15 Например, полинуклеотидные последовательности СУР82Е10,
представленные в настоящем описании, или одну или несколько их частей
можно использовать в качестве зондов, которые могут специфически
гибридизоваться с соответствующими полинуклеотидами специфических для
корня никотиндеметилазы и матричными РНК. Для достижения специфической
гибридизации в различных условиях указанные зонды включают
20 последовательности, которые являются уникальными для полинуклеотидных
последовательностей СУР82Е10 или являются уникальными для одной из
полинуклеотидных последовательностей СУР82Е10, включая расположенные
против хода транскрипции относительно кодирующей последовательности 5'-
области и расположенные по ходу транскрипции относительно кодирующей
25 последовательности 3'-области и интронную область (например, SEQ ID NO: 3),
и предпочтительно содержат по меньшей мере примерно 10 смежных
нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 20 смежных
нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 50 смежных
нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 75 смежных
30 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 100
смежных нуклеотидов. Указанные зонды можно применять для амплификации
соответствующих полинуклеотидов СУР82Е10. Этот метод можно применять
для выделения дополнительных кодирующих последовательностей или мутаций

из требуемого растения или в качестве диагностического анализа, позволяющего определять присутствие кодирующих последовательностей в растении. Метод гибридизации включает гибридизационный скрининг высеянных ДНК-библиотек (либо бляшек, либо колоний; см., например, Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-ое изд, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989).

В контексте настоящего описания касательно взаимосвязей между двумя или большим количеством полинуклеотидов или полипептидов понятие «референс-последовательность» относится к основе, применяемой для сравнения последовательностей. Референс-последовательность можно представлять собой частично или полностью специфическую последовательность; например, сегмент полноразмерной последовательности кДНК или последовательности гена, или полную последовательность кДНК или последовательность гена.

В контексте настоящего описания понятие «окно сравнения» относится к составляющему из смежных нуклеотидов конкретному сегменту полинуклеотидной последовательности, при этом находящаяся в окне сравнения полинуклеотидная последовательность может нести добавления или делеции (т.е. «бреши») по сравнению с референс-последовательностью (в которой отсутствуют добавления или делеции), применяемые для оптимального выравнивания двух полинуклеотидов. Как правило, окно сравнения содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов и необязательно может содержать 30, 40, 50, 100 или большее количество нуклеотидов. Специалистам в данной области известно, что для избежание высокого уровня сходства с референс-последовательностью, достигаемого за счет включения брешей в полинуклеотидную последовательность, как правило, вводят штраф за брешь и вычитают его из количества совпадений.

Методы выравнивания последовательностей с целью их сравнения хорошо известны в данной области. Так, для определения процента идентичности последовательностей любых двух последовательностей можно применять математический алгоритм. Примерами таких математических алгоритмов являются (но, не ограничиваясь только ими) алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS 4, 1988, сс. 11-17; алгоритм локального выравнивания, описанный у Smith и др., Adv. Appl. Math. 2, 1981, с. 482; алгоритм глобального

выравнивания, описанный у Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 1970, сс. 443-453; метод выравнивания, основанный на локальном поиске, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1988, сс. 2444-2448; алгоритм, описанный у Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, с. 2264, модифицированный согласно Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877.

Программы BLAST, описанные у Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, с. 403, основаны на алгоритме Karlin и Altschul, 1990, выше. Исследование нуклеотидных последовательностей с использованием программ BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTN, в которой балл = 100, длина слова = 12, определяя тем самым нуклеотидные последовательности, гомологичные с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует белок, предлагаемый в изобретении. Исследование белков с использованием программ BLAST можно осуществлять с помощью программы BLASTX, в которой балл = 50, длина слова = 3, определяя тем самым аминокислотные последовательности, гомологичные белку или полипептиду, предлагаемому в изобретении. Для выравнивания включающих бреши последовательностей с целью сравнения можно примерять программу Gapped BLAST (входящую в пакет программ BLAST 2.0), которая описана у Altschul и др., Nucleic Acids Res. 25, 1997, с. 3389. В альтернативном варианте для осуществления итерационного поиска можно применять программу PSI-BLAST (входящую в пакет программ BLAST 2.0), которая позволяет определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (см. Altschul и др., 1997, выше). При применении BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можно использовать задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, BLASTN для нуклеотидных последовательностей, BLASTX для белков) (см. www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание можно осуществлять вручную на основе визуальной оценки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни идентичности/сходства последовательностей, указанные в настоящем описании, рассчитывали с использованием алгоритмов BLASTX (Altschul и др., 1997, выше), Clustal W (Higgins и др., Nucleic Acids Res. 22, 1994, сс. 4673-4680) и GAP (входит в пакет программ, разработанных группой вычислительной генетики Висконсинского университета (University of Wisconsin Genetic

Computing Group)) с использованием задаваемых по умолчанию параметров. Под
объем настоящего изобретения подпадает также применение эквивалентной
программы для анализа и сравнения нуклеотидных и белковых
последовательностей. Под «эквивалентной программой» подразумевают любую
5 программу, предназначенную для анализа последовательностей, которая
позволяет для любых двух рассматриваемых последовательностей осуществлять
выравнивание, включающее соответствие идентичных нуклеотидов или
аминокислотных остатков, и дает такой же процент идентичности
последовательностей, что и полученный при соответствующем выравнивании с
10 помощью программ BLASTX, Clustal W или GAP.

Для целей приведенного ниже обсуждения вариантов нуклеотидных и
полипептидных последовательностей, подпадающих под объем настоящего
изобретения, понятие «идентичность последовательностей» или «идентичность»
в контексте двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей
15 относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются
одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в конкретном
окне сравнения. Когда процент идентичности последовательностей применяют
касательно белков, то принимают, что положения неидентичных остатков часто
отличаются консервативными аминокислотными заменами, при которых
20 аминокислотный остаток заменен на другие аминокислотные остатки со
сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность) и
поэтому не происходит изменения функциональных свойств молекулы. Когда
последовательности отличаются консервативными заменами, то процент
идентичности последовательностей можно повышать для корректировки с
25 учетом консервативной природы замены. Говорят, что последовательности,
которые отличаются консервативными заменами, обладают «сходством
последовательностей» или «сходством». Пути осуществления такой
корректировки, хорошо известны специалистам в данной области. Как правило,
они заключаются в том, что при назначении балльной оценки консервативную
30 замену рассматривают как частичный, а не полный мисмэтч, что повышает
процент идентичности последовательностей. Так, например, если идентичность
аминокислот характеризуется баллом 1, а неконсервативная замена
характеризуется баллом ноль, то консервативная замена характеризуется

баллом, находящийся между нулем и 1. Для расчета баллов, которые присваиваются консервативным заменам, например, используют программу PC/GENE (фирма Intelligenetics, Маунтин-Вью, шт. Калифорния).

В контексте настоящего описания «процент идентичности последовательностей» означает величину, которую определяют путем сравнения двух оптимальным образом выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может нести добавления или делеции (т.е. бреши) по сравнению с референс-последовательностью (в которой отсутствуют добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают, определяя количество положений, в которых находятся идентичные нуклеотидные основания или аминокислотные остатки в обеих последовательностях, устанавливая количество соответствующих положений, осуществляя деление количества соответствующих положений на общее количество положений в окне сравнения, и умножая результат на 100, получая тем самым процент идентичности последовательностей.

Так, полинуклеотидные и полипептидные последовательности CYP82E10 можно идентифицировать с использованием последовательностей, которые представлены в настоящем описании. Такие методы заключаются в том, что получают полинуклеотидную или полипептидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 3 или 4, или ее комплементу или фрагменту, или идентична полипептидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 или 5-13. В предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептид, соответствующий SEQ ID NO: 2, имеет серин в положении 79, 107 или 382 полипептида CYP82E10, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

Способы ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилазы

Предложены способы снижения концентрации, содержания и/или активности полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, в растениях или частях растений *Nicotiana*, в частности, в корневой ткани. Целый ряд способов можно использовать индивидуально или в сочетании для снижения или элиминации активности полипептида CYP82E10 (SEQ ID NO: 2), предлагаемого

в настоящем изобретении, и его вариантов, которые сохраняют активность никотиндеметираз (например, SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10). Кроме того комбинации способов можно применять для снижения или элиминации активности двух или большего количества различных никотиндеметираз, более конкретно, специфической для корня никотиндеметиразы CYP82E10 и одной или обеих никотиндеметираз, таких как специфическая для зеленых листьев никотиндеметиразы CYP82E5 и индуцируемая старением никотиндеметиразы CYP82E4. В конкретном варианте осуществления изобретения CYP82E5 представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере одну мутацию аминокислоты в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, которая оказывает отрицательное воздействие на превращение в зеленых листьях, и CYP82E4 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, которая содержит по меньшей мере одну мутацию аминокислоты, оказывающую отрицательное воздействие на превращение в стареющих листьях.

Согласно настоящему изобретению считается, что имеет место ингибирование экспрессии никотиндеметиразы CYP82E10, предлагаемой в настоящем изобретении, если уровень белка, представляющего собой полипептид CYP82E10, статистически ниже уровня белка, представляющего собой этот же полипептид CYP82E10, в растении, которое не является генетически модифицированным или измененным с помощью мутаций, что приводит к ингибированию экспрессии указанного полипептида CYP82E10, и при этом указанные растения культивировали и собирали их урожай с использованием таких же протоколов. В конкретных вариантах осуществления изобретения уровень белка, представляющего собой полипептид CYP82E10, в модифицированном растении, предлагаемом в изобретении, ниже на 95%, ниже на 90%, ниже на 80%, ниже на 70%, ниже на 60%, ниже на 50%, ниже на 40%, ниже на 30%, ниже на 20%, ниже на 10% или ниже на 5% уровня белка, представляющего собой такой же полипептид CYP82E10, в растении, которое не является мутантным или генетически модифицированным, что приводит к ингибированию полипептида CYP82E10, и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких же протоколов. Уровень экспрессии полипептида CYP82E10 можно измерять непосредственно, например, оценивая уровень транскрипта CYP82E10 или полипептида CYP82E10, экспрессируемого

в растении или части растения табака, или косвенно, например, измеряя уровень превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Методы мониторинга уровня экспрессии белка известны в данной области и включают (но, не ограничиваясь только ими) анализ методом Нозерн-блоттинга и анализ дифференцировки РНК. Методы определения активности целевого полипептида CYP82E10 в отношении превращения никотина в норникотин известны в данной области и представлены ниже в настоящем описании, и они включают (но, не ограничиваясь только ими) анализ алкалоидов с помощью газовой хроматографии.

10 В настоящем изобретении предложены способы снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака. Способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилаз, где мутация
15 снижает экспрессию гена никотиндеметилазы и где первый из указанных генов никотиндеметилаз кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или части растения табака. В некоторых вариантах осуществления изобретения специфическая для корня никотиндеметилаза
20 представляет собой CYP82E10 или ее вариант. В других вариантах осуществления изобретения указанные способы заключаются в том, что интродуцируют в геном растения табака мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который кодирует CYP82E10 или ее вариант, и мутацию по меньшей мере в один аллель гена никотиндеметилазы, который
25 кодирует CYP82E4 или ее вариант, и/или гена никотиндеметилазы, который кодирует CYP82E5 или ее вариант.

Для объединения мутаций в одном растении использовали ряд подходов, в том числе половое скрещивание. Растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует активность никотиндеметилаз в
30 корнях, можно скрещивать с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене *CYP82E4v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, или скрещивать с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене *CYP83E5v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную

активность в зеленых листьях, с получением растения, которое обладает пониженным уровнем превращения никотина в норникотин. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения скрещивания осуществляют для интродукции предпочтительной мутации в ген *CYP82E10*, *CYP82E4v2* и *CYP82E5v2* в одном и том же растении. Таким образом, растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует активность никотиндеметиلاз в корнях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене *CYP82E4v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, и предпочтительную мутацию в гене *CYP83E5v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях. В альтернативном варианте растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене *CYP82E4v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в корнях, и предпочтительную мутацию в гене *CYP83E5v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях. В следующем варианте осуществления изобретения растение, имеющее предпочтительную мутацию в гене *CYP82E5v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в зеленых листьях, скрещивают с растением, имеющим предпочтительную мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в корнях, и предпочтительную мутацию в гене *CYP83E4v2*, которая ингибирует никотиндеметилазную активность в стареющих листьях. Путем интродукции предпочтительной мутации в каждый из указанных генов никотиндеметилаз можно получать растение, имеющее пониженные уровни превращения никотина в норникотин, при этом уровни превращения не превышают примерно 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% или 0,7%.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения растение, имеющее одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида *CYP82E10* в положении 79, 107, 382 или 419 (где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2), можно скрещивать с растением, имеющим одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида *CYP82E4* в положении

329, 364, 376, 382 или 458, и/или имеющим одну или несколько предпочтительных мутаций, которая(ые) приводит(ят) к модификации полипептида CYP82E5 в положении 422 или 449, с получением растения, в котором уровни превращения не превышают примерно 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% или 0,7%. Наиболее предпочтительный уровень превращения никотина в норникотин может составлять от 0,05% до 0,4%, от 0,1 до 0,6%, от 0,1% до 0,3%, от 0,1% до 0,5%, от 0,1% до 0,4%, от 0,1% до 0,7%, от 0,1% до 1,0%, от 0,1% до 1,1%, от 0,1% до 1,2%, от 0,1% до 1,3%, от 0,1% до 1,4% или от 0,1% до 1,5%. Любая мутация в полинуклеотиде, предлагаемом в настоящем изобретении, которая приводит к укорочению полипептида CYP82E10, CYP83E4 или CYP83E5 перед консервативным связывающим гем мотивом должна ингибировать фермент и ее можно применять в указанном выше скрещивании. Домены белков цитохрома P450 известны в данной области (см., например, Xu и др., *Physiologia Plantarum* 129, 2007, сс. 307-319, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки). Путем скрещивания растений с нефункциональным или заингибированным геном *CYP82E10*, с растениями с нефункциональным или заингибированным геном *CYP82E4v2*, с нефункциональным или заингибированным геном *CYP82E5v2* или с нефункциональными или заингибированными генами *CYP82E4v2* и *CYP82E5v2* можно получать растение табака с пониженными уровнями норникотина.

Активность полипептида никотиндеметилазы CYP82E10, CYP82E4 или CYP82E5 в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака является заингибированной согласно настоящему изобретению, если активность в отношении указанного превращения статистически ниже, чем активность в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы в растении или части растения табака, которое не подвергалось генетической модификации для ингибирования активности в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожай с использованием таких же протоколов. В конкретных вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в модифицированном растении или части растения табака, предлагаемого/предлагаемой в изобретении, является заингибированной, если

активность составляет менее 95%, менее 90%, менее 80% менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 2% или менее 1% от активности в отношении превращения полипептида такой же никотиндеметилазы в растении табака, которое не подвергалось генетической модификации для ингибирования экспрессии полипептида такой же никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожаем с использованием таких же протоколов. Активность полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака является элиминированной согласно изобретению, когда она находится ниже предела обнаружения с помощью методов, представленных в настоящем описании. Методы определения активности полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении табака с использованием газовой хроматографии представлены ниже в примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительную мутацию интродуцируют в растение или часть растения табака с помощью мутагенеза и интродуцированную мутацию выбирают с помощью методов, известных специалистам в данной области, таких как (но, не ограничиваясь только ими) анализ методом Саузерн-блоттинга, секвенирование ДНК, анализ на основе ПЦР или фенотипический анализ. Растение или часть растения, измененного или модифицированного согласно указанным выше вариантам осуществления изобретения, выращивают в условиях, в которых происходит образование растения, в течение периода времени, достаточного для модуляции концентрации и/или активности полипептидов, предлагаемых в настоящем изобретении, в растении. Условия, в которых происходит образование растения, хорошо известны в данной области и кратко указаны ниже в настоящем описании.

Модифицированное растение табака, содержащее предпочтительную мутацию в никотиндеметилазе, представленную в настоящем описании, отличается пониженным уровнем превращения никотина в норникотин. В конкретных вариантах осуществления изобретения уровень превращения никотина в норникотин в модифицированном растении или части растения табака, предлагаемом/предлагаемой в изобретении, составляет менее 95%, менее

90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%,
менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 2% или менее 1% от уровня
превращения в растении табака, которое не подвергалось генетической
модификации для ингибирования экспрессии полипептида такой же
5 никотиндеметилазы и которое культивировали и собирали его урожай с
использованием таких же протоколов. В некоторых вариантах осуществления
изобретения модифицированное растение табака представляет растение табака,
являющееся конвертером. В других вариантах осуществления изобретения
модифицированное растение табака представляет собой растение табака, не
10 являющееся конвертером. В некоторых вариантах осуществления изобретения
модифицированное растение табака отличается более низким уровнем
превращения по сравнению с уровнем, обнаруженным в коммерческих растениях
табака, которые не являются конвертерами.

Согласно настоящему изобретению изменения в уровнях, соотношениях,
15 активности или распределении полипептидов СУР82Е10, предлагаемых в
настоящем изобретении, или изменения фенотипа растения или части растения
табака, прежде всего снижение накопления норникотина и его онкогенного
метаболита NNN можно измерять, сравнивая анализируемое растение или часть
растения с контрольным растением или частью растения, где анализируемое
20 растение или часть растения и контрольное растение или часть растения
культивировали и/или собирали их урожай с использованием таких же
протоколов. В контексте настоящего описания анализируемое растение или
часть растения представляет собой растение или часть растения, в котором
генетическое изменение, например, полученное с помощью мутагенеза, влияет
25 на представляющий интерес полипептид никотиндеметилазы или представляет
собой растение или часть растения табака, являющееся потомком растения или
части растения табака, измененного таким образом и содержащего указанную
модификацию. Контрольное растение или часть растения представляет собой
стандарт для оценки изменений фенотипа анализируемого растения или части
30 растения. Оценку изменений фенотипа растения или части растения можно
осуществлять в любой момент времени, в том числе в процессе развития,
старения растения или после сушки. В других вариантах осуществления
изобретения оценку изменений фенотипа можно осуществлять в растениях,

выращенных в каких-либо других условиях, в том числе в растениях, выращенных в вегетационной камере, теплице или в поле. В одном из вариантов осуществления изобретения оценку изменения фенотипа можно осуществлять путем определения уровня превращения никотина в норникотин. В

5 предпочтительном варианте осуществления изобретения уровень превращения можно оценивать путем деления процентного содержания норникотина (в виде процента относительно общей массы ткани) на сумму процентного содержания никотина и норникотина (в виде процента относительно общей массы ткани) и умножения на 100.

10 Согласно настоящему изобретению контрольное растение или часть растения может представлять собой растение или часть растения табака дикого типа, т.е. такого же генотипа, что и исходный материал для генетического изменения, приводящего к получению анализируемого растения или части растения. Контрольное растение или часть растения может представлять собой
15 также растение или часть растения табака такого же генотипа, что и исходный материал, но быть трансформированным «нулевой» конструкцией (т.е. конструкцией, для которой отсутствуют данные о воздействии на представляющий интерес признак, например, конструкцией, которая содержит селектируемый маркерный ген). Во всех случаях анализируемое растение или
20 часть растения и контрольное растение или часть растения культивируют и собирают их урожай с использованием таких же протоколов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении, можно снижать или элиминировать, нарушая ген, который кодирует полипептид
25 никотиндеметилазы. Изобретение относится к подвергнутым мутагенезу растениям, которые несут мутации в генах никотиндеметилазы, где мутации приводят к снижению экспрессии гена никотиндеметилазы или ингибированию активности кодируемого полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении.

30 В других вариантах осуществления изобретения активность полипептида никотиндеметилазы, предлагаемого в настоящем изобретении, снижают или элиминируют путем нарушения гена, который кодирует полипептид никотиндеметилазы. Ген, который кодирует полипептид никотиндеметилазы

можно нарушать с помощью любого метода, известного в данной области, например, транспозонного мечения или мутагенеза растений посредством неспецифического или направленного мутагенеза, и отбора растений с пониженным уровнем никотиндеметилазной активности или с мутациями только в CYP82E10 или в сочетании с мутациями в CYP82E4 или CYP82E5.

Транспозонное мечение можно применять для снижения или элиминации активности одного или нескольких полипептидов никотиндеметилаз CYP82E10, предлагаемых в изобретении. Транспозонное мечение предусматривает встраивание транспозона в эндогенный ген никотиндеметилазы для снижения или элиминации экспрессии полипептида никотиндеметилазы.

Методы транспозонного мечения конкретных генов в растениях хорошо известны в данной области (см., например, Maes и др., Trends Plant Set 4, 1999, сс. 90-96; Dharmapuri и Sonti, FEMS Micerobiol. Lett. 179, 1999, сс. 53-59; Meissner и др., Plant J. 22, 2000, сс. 265- 274; Phogat и др., J. Biosci. 25, 2000, сс. 57-63; Walbot, Curr. Opin. Plant Biol. 2, 2000, сс. 103-107; Gai и др., Nucleic Acids Res. 28, 2000, сс. 94-96; Fitzmaurice и др., Genetics 153, 1999, сс. 1919-1928).

В данной области известны также и другие методы снижения или элиминации экспрессии эндогенных генов в растениях и их также можно применять согласно настоящему изобретению. Указанные методы включают другие формы мутагенеза с использованием мутагенных или онкогенных соединений, например, индуцированный этилметансульфонатом (ЭМС) мутагенез, делеционный мутагенез и делеционный мутагенез с использованием быстрых нейтронов, применяемый для «обратной генетики» (с использованием ПЦР) для идентификации линий растений, в которых удален путем делеции эндогенный ген. Примеры указанных методов представлены у Ohshima и др., Virology 213, 1998, сс. 472-481; Okubara и др., Genetics 137, 1994, сс. 867-874 и у Quesada и др., Genetics 154, 2000, сс. 421-4315; каждая из публикаций включена в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, согласно изобретению можно применять также быстрый и автоматизированный метод скрининга индуцируемых химическими соединениями мутаций, TILLING (введение индуцированных локальных повреждений в геном (Targeting Induced Local Lesions In Genomes), методы с применением денатурирующей ЖХВР или избирательного эндонуклеазного расщепления отобранных ПЦР-продуктов (см.

McCallum и др., Nat. Biotechnol. 18, 2000, сс. 455-457, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Мутации, которые нарушают экспрессию гена или оказывают воздействие на функцию кодируемого белка никотиндеметилазы, можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Инсерционные мутации в экзонах гена, как правило, приводят к получению нуль-мутантов. Мутации в консервативных остатках могут оказаться особенно эффективными в отношении ингибирования метаболической функции кодируемого белка. Описаны консервативные остатки полипептидов растительных никотиндеметилаз, пригодные для мутагенеза с целью элиминации активности полипептида никотиндеметилазы в отношении превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака (см. фиг. 1А-В опубликованной заявки на патент США № 2009/0205072 А1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки, где остатки, отличающиеся от других полипептидов Р450, выделены серым цветом). Консервативный остаток представляет собой остаток в каждом положении, который не выделен серым цветом. Указанные мутанты можно выделять согласно процедурам, хорошо известным в данной области.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения можно применять доминантные мутации для обеспечения молчания РНК посредством инверсии гена и рекомбинации содержащего два аллеля локуса гена (см. например, Kusaba и др., Plant Cell 15, 2003, сс. 1455-1467).

Согласно другому варианту осуществления изобретения композиции, предлагаемые в изобретении, находят применение в методах скрининга для идентификации растений, не являющихся конвертерами, которые предназначены для применения в программах селекции. Для этого можно применять нуклеотидные последовательности, предлагаемые в изобретении, для скрининга нативной зародышевой плазмы растений, не являющихся конвертерами, которые имеют стабильную мутацию в гене *CYP82E10*, идентифицированную согласно настоящему описанию. Указанные растения, не являющиеся конвертерами, идентифицированные с помощью способов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять для создания чистых линий.

Помимо нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептиды CYP82E10, представленные в настоящем описании, композиции, предлагаемые в изобретении, включают интронную последовательность в последовательности гена *CYP82E10*, которую можно применять в методах скрининга. Не вдаваясь в какой-либо механизм действия, можно считать, что ген(ы) CYP82E10 может(гут) являться только представителем(ями) семейства цитохрома P450, участвующего в метаболическом превращении никотина в норникотин в корнях табака. Для ряда вариантов применения может оказаться полезным иметь средства для диагностической дифференциации указанного конкретного представителя семейства генов цитохрома P450 от остальных близкородственных последовательностей в этой семействе. Например, возможно, что во встречающейся в естественных условиях зародышей плазме табака (или в подвергнутых мутагенезу популяциях) могут существовать дополнительные варианты, в которых этот ген в естественных условиях имеет нарушенную функцию и поэтому может являться ценным в качестве перманентного источника неконвертеров. Указанные последовательности с нарушенной функцией могут представлять собой последовательности, которые кодируют полипептиды, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 11, 12 или 13. Метод специфического анализа указанных генотипов (например, делеционных мутантов, реаранжировок и т.п.) может служить в качестве эффективного инструмента. В настоящем изобретении описаны праймеры, созданные для специфической амплификации экзона 1 и экзона 2 *CYP82E10*, при этом одна из двух пар праймеров соответствует интрону, расположенному между экзонами. Примеры праймеров, которые можно применять для амплификации экзонов *CYP82E10*, имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 35 плюс SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37 плюс SEQ ID NO: 38. Эти же праймеры можно применять для анализа последовательностей продуктов.

Поскольку интронные области генов, как правило, являются менее консервативными по сравнению с экзонами, можно предположить, что применение специфического для интрона зонда должно с большей эффективностью отличать ген(ы), соответствующие гену *CYP82E10*, от других представителей семейства *CYP82E*. Применение специфического для интрона

CYP82E10 зонда и/или ПЦР-праймеров, используемых для создания продуктов, представляет собой эффективные инструменты в анализах, предназначенных для решения вопроса о том, несут ли любые встречающиеся в естественных условиях или подвергнутые мутагенезу растения табака делеции или реаранжировки, которые делают ген неактивным. Указанное растение можно затем применять в программах селекции для создания линий табака, в которых не может происходить указанное превращение.

Растения, части растений табака и изделия с пониженным содержанием норникотина и NNN

Полинуклеотиды *CYP82E10*, предлагаемые в изобретении, и их варианты и фрагменты можно применять в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, для ингибирования экспрессии или функции никотиндеметилаз *CYP82E10*, которые участвуют в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении. Таким образом, предпочтительные мутации можно интродуцировать в представляющий интерес ген *CYP82E10*. Способы, предлагаемые в изобретении, не зависят от конкретного метода интродукции предпочтительной мутации в ген *CYP82E10* никотиндеметилазы.

Композиции и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для снижения содержания норникотина, в частности в листьях и стеблях любого растения рода *Nicotiana*, включая (но, не ограничиваясь только ими) следующие виды: *acuminata*, *affinis*, *alata*, *attenuate*, *bigelovii*, *clevelandii*, *excelsior*, *forgetiana*, *giauca*, *glutinosa*, *langsдорffii*, *longiflora*, *obtusifolia*, *palmeri*, *paniculata*, *plumbaginifolia*, *quadrivalvis*, *repanda*, *rustica*, *suaveolens*, *sylvestris*, *tabacum*, *tomentosa*, *trigonophylla* и *x sanderae*. Настоящее изобретение можно также воплощать на практике с использованием любых сортов растения рода *Nicotiana*, включая (но, не ограничиваясь только ими) *Nicotiana acuminata multiflora*, *Nicotiana alata grandiflora*, *Nicotiana bigelovii quadrivalvis*, *Nicotiana bigelovii wallacei*, *Nicotiana obtusifolia obtusifolia*, *Nicotiana obtusifolia plameri*, *Nicotiana quadrivalvis bigelovii*, *Nicotiana quadrivalvis quadrivalvis*, *Nicotiana quadrivalvis wallacei* и *Nicotiana trigonophylla palmeri*, а также различных известных сортов, известных как сорта, подвергаемые сушке на пару, или светлые сорта, сорта табака Бёрли, темные сорта и восточные/турецкие сорта. В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющее интерес

растение табака представляет собой растение сорта Бёрли, Вирджиния, растение, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта восточный или растение, из которого получают темный сорт табака.

5 Растения табака и сорта, представленные в настоящем описании, можно применять для выращивания и сбора урожая с помощью общепринятых методов, таких как культивирование в богатых перегноем почвах или без перегноя, с помещением цветков в мешки или без указанной защиты или с укорачиванием верхушек или без укорачивания. Собранные листья и стебли можно применять в любых традиционных табачных изделиях, включая (но, не ограничиваясь только 10 ими) трубочный, сигарный и сигаретный табак и жевательный табак в любой форме, в том числе листовой табак, раскрошенный табак или нарезанный табак.

Таким образом, настоящее изобретение относится к растению или части растения табака, содержащего/содержащей мутации в гене, который кодирует никотиндеметиразу CYP82E10, где мутация приводит к пониженной экспрессии 15 или функции никотиндеметираз CYP82E10 и к уменьшенному количеству норникотина и N'-нитрозонорникотина. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «уменьшенное количество» или «пониженный уровень» относятся к количеству норникотина и/или N'-нитрозонорникотина в растении, предлагаемом в настоящем изобретении, или части растения табака 20 или табачном изделии, более низкому по сравнению с обнаруженным в растении рода *Nicotiana* или части растения или табачном изделии из такого же сорта табака, обработанного (т.е. культивированного и собранного) таким же образом, но которое не было генетически модифицировано с целью снижения уровня норникотина и/или N'-нитрозонорникотина. Количество норникотина может 25 быть снижено от примерно на 10% до более чем примерно на 90%, в том числе более чем примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70% и примерно на 80%. Превращение никотина в норникотин может составлять менее 0,3%, менее 0,5%, менее 0,7%, менее 0,1%-0,5%, от 0,1% до 0,4%, от 0,1% до 0,7% или от 0,1% до 1,0% в 30 растениях, частях растений и продуктах, предлагаемых в настоящем изобретении, и более конкретно в растениях, частях растений, имеющих мутации в CYP82E10, CYP82E4v2 и CYP825v2.

Понятие «табачные изделия» в контексте настоящего описания относится (но, не ограничиваясь только ими) к продуктам, предназначенным для курения (например, любые сигареты, включая сигариллы (сигара в табачном листе), сигареты с невентилируемым фильтром или сигареты с вентилируемым рецесс-фильтром, сигары, трубочный табак), продукты, не пригодные для курения (например, нюхательный табак, жевательный табак, биоразложимые вставки (например, гумми, лепешки, растворимые полоски)) (см., например, US 2005/0019448, который включен в настоящее описание в качестве ссылки). Настоящее изобретение относится также к смесевым табачным изделиям, которые можно получать, объединяя обычный табак с различными количествами табака с низким уровнем норникотина и/или N'-нитрозонорникотина, представленного в настоящем описании. В других вариантах осуществления изобретения растение или часть растения рода *Nicotiana*, описанное/описанная выше, представляет собой высушенный табак.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения табачное изделие характеризуется пониженным онкогенным потенциалом дыма табака, который непосредственно вдыхается при использовании табачного изделия (такого как сигары, сигареты или трубочный табак) или вдыхается в виде вторичного табачного дыма (т.е. в том случае, когда индивидуум вдыхает табачный дым, который образуется при курении другим индивидуумом табачного изделия, такого как сигары, сигареты или трубочный табак). Высушенный табак, представленный в настоящем описании, можно применять для изготовления табачного изделия, прежде всего изделия, которое подвергнуто химическим изменениям в результате нагревания, которое содержит уменьшенное количество норникотина и/или N'-нитрозонорникотина в струе дыма, который вдыхают непосредственно или вдыхают в виде вторичного дыма. Аналогично этому табачные изделия, предлагаемые в изобретении, можно применять для изготовления бездымных табачных изделий, таких как жевательный табак, нюхательный табак и т.п.

Таким образом, табачные изделия, изготовленные из растений табака, предлагаемых в настоящем изобретении, находят применение в способах снижения онкогенного потенциала указанных табачных изделий и снижения воздействия на людей онкогенного нитрозамина NNN, прежде всего на

индивидуумов, которые употребляют табачные изделия. Представленные ниже примеры служат для иллюстрации изобретения и не направлены на ограничение его объема.

Экспериментальный раздел

5 Ссылки, процитированные в представленном ниже разделе, приведены сразу после «Экспериментального раздела».

Известный уровень техники

Данные о том, что *CYP82E4v2* представляет собой локус
никотиндеметилазы, ответственной для высокий уровень накопления
10 норникотина в растениях-конвертерах (Siminszky и др., 2005), открыли путь к
нетрансгенным, а также трансгенным подходам, которые позволяют решать
проблему, связанную с превращением, и снижать содержание норникотина в
состарившихся высушенных листьях. В частности, это позволяет исследователям
создавать популяции табака, обработанные химическим мутагеном, и отбирать
15 особи, которые несут нефункциональные аллели в локусе *CYP82E4v2*.
Действительно, на основе указанной стратегии три независимые группы
исследователей уже создали линии табака, в которых не происходит
превращение (Dewey и др., 2007; Xu и др., 2007б; Julio и др., 2008).

Как указано ранее, растение табака, обозначенное 775, идентифицировали в
20 популяции линии сорта Бёрли DN98-325-6, для обработки которой в качестве
мутагена применяли ЭМС, и у этого растения обнаружена вызывающая
«выключение» мутация в гене *CYP82E4v2* (Dewey и др., 2007). Осенью 2008 г.
растения, гомозиготные по мутации 775, выращивали на исследовательской
станции Upper Coastal Plains в г. Роки-Маунт, шт. Северная Каролина и
25 подвергали воздушной сушке согласно стандартной промышленной практике.
Анализ алкалоидов в этом материале осуществляли согласно «LC Protocol»
(«протокол ЖХ»), описанного у Jack и др., 2007. Как видно из таблицы 1, у
растений, несущих мутацию 775, средний уровень превращения никотина в
норникотин составлял 2,6%. В отличие от этого у родительской линии DN98-
30 325-6, которая имела сильный конвертерный генотип, был обнаружен уровень
превращения, составлявший >60%. Практически идентичные результаты
опубликованы Julio и др., 2008, было установлено, что для растений,
гомозиготных по вызывающей «выключение» мутации *cyp82e4v2*, у линии сорта

Бёрли с сильным конвертерным генотипом BB16NN (уровень превращения у родительской линии составлял от 68 до 98%) процент превращения составлял от 2,82 до 3,37. Таким образом, ослабляющие мутации, введенные только в ген *CYP82E4v2*, вероятно, являются эффективными в отношении устранения проблем, связанных с нестабильным генетическим феноменом, который ассоциирован с поколением растений-конвертеров.

Таблица 1. Профили алкалоидов в экспериментальном материале, которые оценивали в полевом опыте в 2008 г. Величины, выраженные в процентах, представляют собой средние значения.

Генотип	Ген-мишень	Мутация ^б	Аминокислотная замена	Содержание никотина ^в (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения ^г
DN98-325-6 контроль (15) ^а	контроль	-	-	1,228	2,014	0,016	0,125	62,5
TN90LC (14)	контроль	-	-	4,680	0,157	0,022	0,155	3,2
DN98-325-6 РНКi 300-08 №1 (15)	<i>CYP82E4v2</i> и родственные гены	-	-	3,351	0,040	0,016	0,101	1,2
DN98-325-6 РНКi 300-02 №1 (15)	<i>CYP82E4v2</i> и родственные гены	-	-	3,741	0,026	0,017	0,106	0,7
DN98-325-6 №775 гомозиготный (15)	<i>CYP82E4v2</i>	G986A	W329Stop	2,941	0,077	0,013	0,093	2,6
DN98-325-6 гомозиготный (14)	<i>CYP82E5v2</i>	G1266A	W422Stop	1,005	1,876	0,012	0,097	65,2
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (9)		двойная	двойная	3,160	0,076	0,015	0,117	2,3

^аЧисла в скобках обозначают общее количество проанализированных растений.

^бНумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК.

5 ^вПроценты рассчитывали на основе сухой массы табака.

^г Процент превращения никотина определяли из уравнения: [% норникотина/(% норникотина + % никотина)] × 100.

Хотя применение растений табака, несущих мутацию 775 или сопоставимые мутации в *CYP82E4v2*, может представлять собой эффективное средство элиминации интродукции растений-конвертеров в популяции табака, в этих растениях все еще сохраняется небольшое, но имеющее существенное значение количество норникотина. С учетом того, что в трансгенных растениях, экспрессирующих конструкцию для РНКi, мишенью которой является *CYP82E4v2* (Lewis и др., 2008), обнаружены уровни превращения никотина в норникотин, близкие к 0,45%, очевидно, что по меньшей мере еще один другой ген, последовательность которого обладает высокой гомологией с последовательностью ДНК *CYP82E4v2*, должен быть ответствен за основной синтез норникотина, присутствующий как в растениях, не являющихся конвертерами, так и в растениях-конвертерах, которые имеют неактивированный ген *CYP82E4v2*. Это предположение нашло дополнительное подтверждение, когда был обнаружен ген *CYP82E5v2*, последовательность ДНК которого на 92,7% идентична последовательности гена *CYP82E4v2*, который, как установлено, кодирует также функциональный фермент никотиндеметилазу (Dewey и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007). Низкий уровень экспрессии гена *CYP82E5v2* никотиндеметилазы обнаружен в зеленых табачных листьях растений-конвертеров, а также растений, не являющихся конвертерами, в отличие от гена *CYP82E4v2*, для которого характерны очень высокие уровни экспрессии, но только в листьях растений-конвертеров в процессе старения и воздушной сушки.

Как описано у Dewey и др., 2007, скрининг популяции табака DH98-325-6, для обработки которой в качестве мутагена применяли ЭМС, позволил идентифицировать индивидуальное растение (растение 1013), несущее приводящую к «выключению» мутацию в гене *CYP82E5v2*. Для определения воздействия нефункционального аллеля *cyp82e5v2* на накопление норникотина осуществляли скрещивания, которые позволяли объединять мутации из растений 775 и 1013. Молекулярное генетипирование нескольких особей F₂-поколения, полученных из F₁-потомства начального скрещивания, позволило идентифицировать девять особей, гомозиготных по обоим мутациям (*e4e4/e5e5*). Эти девять растений включали также в полевой опыт, проведенный в 2008 г. Несмотря на тот факт, что, как установлено, *CYP82E5v2* кодирует

функциональный фермент никотиндеметилазу (Dewey и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007), объединение нарушающей функцию мутации *cyp82e5v2* с вызывающей «выключение» мутацией *cyp82e4v2* оказывало очень небольшое воздействие на уровни норникотина в листьях. Как видно из таблицы 1, у 5 растений, гомозиготных по двойной мутации (*e4e4/e5e5*), средний уровень превращения никотина составлял 2,3%, для сравнения средний уровень превращения в растениях, несущих только мутацию *cyp82e4v2* (*e4e4*), составлял 2,6%. Небольшое различие в среднем уровне превращения между двумя 10 генотипами оказалось статистически незначимым ($P = 0,118$). В отличие от этого, в одной из трансгенных линий, включенной в этот опыт, в которой «молчание» *CYP82E4v2* достигалось с помощью РНКi, средний уровень превращения в которой составлял 0,7%, количество оказалось значимо более 15 низким ($P < 0,001$), чем полученное как для генотипа *e4e4*, так и для генотипа *e4e4/e5e5*. Таким образом, в геноме табака должен существовать другой ген с высокой гомологией с *CYP82E4v2*, который принимает участие в производстве норникотина в растении.

Пример 1: Выделение и характеристика гена *cyp82e10* никотиндеметилазы

Для идентификации других генов в геноме табака, которые могут кодировать ферменты никотиндеметилаз, исследовали гомологию с помощью 20 алгоритмов BLASTN и BLASTX (Altschul и др., 1990, 1997) с использованием баз данных для экспрессируемых секвенированных меток (ярлыков) (EST) в GenBank, применяя ДНК и белковые последовательности *CYP82E4v2* в качестве соответствующих «запрашиваемых» последовательностей. Кроме того, для 25 идентификации последовательностей кДНК, соответствующих ранее охарактеризованным представителям суперсемейства *CYP82E* (таким как *CYP82E2*, *CYP82E3* и *CYP82E5v2*), было обнаружено семь EST, которые не соответствовали точно ни одному из ранее охарактеризованных представителей этого семейства генов.

Важно отметить, что все из семи EST, получали либо из библиотек 30 специфических для корня кДНК, либо библиотек кДНК, созданных из смешанных тканей, которые включали корни. Эти данные позволяют предположить, что новый ген *CYP82E* экспрессируется специфически в ткани корня, указанная особенность позволяет объяснить, почему этот конкретный

представитель суперсемейства *CYP82E* P450 ранее не был обнаружен, так как ранее исследования были сфокусированы на характеристике генов *CYP82E*, которые экспрессировались в листовой ткани. Поскольку никакой индивидуальной последовательности EST недостаточно для перекрытия полной кодирующей области этого нового гена, создавали ПЦР-праймеры, которые обладали способностью обеспечивать амплификацию полной последовательности кДНК из первой цепи кДНК, которую создавали из РНК, выделенной из ткани корня табака. Кроме того, применяли праймеры для амплификации соответствующей геномной области гена, которая включала центральный крупный интрон. Эта новая кДНК *CYP82E* характеризовалась идентичностью на уровне 92,4% от нуклеотидной последовательности кДНК гена *CYP82E4v2* табака и предсказанной идентичностью на уровне 91,1% аминокислотных последовательностей. В соответствии с рекомендациями по номенклатуре гена P450 этот новый ген обозначили как *CYP82E10*. При сравнении со всеми охарактеризованными представителями суперсемейства *CYP82E* ген *CYP82E10* отличается наиболее высоким уровнем сходства последовательностей с геном *CYP82E5v2*, при этом идентичность на уровне нуклеотидных последовательностей кДНК составляет 96,5% и предсказанная идентичность на уровне аминокислотных последовательностей составляет 95,7%. Последовательность ДНК *CYP82E10* и предсказанная белковая последовательность представлены на фиг. 1.

Хотя кДНК различных представителей семейства *CYP82E* имеют тенденцию к высокой консервативности, геномные версии этих генов отличаются существенно большим разнообразием последовательностей. Это прежде всего является следствием значительной дивергенции последовательностей, обнаруженной в крупном центральном интроне. Сравнительный анализ первичной структуры геномных последовательностей *CYP82E4v2*, *CYP82E5v2* и *CYP82E10* представлен на фиг. 2. Как рассчитано с помощью алгоритма выравнивания пар оснований EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html), нуклеотидные последовательности генов *CYP82E4v2* и *CYP82E10* идентичны на 78,3%, а нуклеотидная последовательность гена *CYP82E10* идентична на 84,9% нуклеотидной последовательности гена *CYP82E5v2*, поскольку они

присутствуют в геноме табака (геномные последовательности *CYP82E4v2* и *CYP82E5v2* идентичны на 75%).

Как подробно описано в нескольких публикациях, большинство генов суперсемейства *CYP82E*, обнаруженных в геноме табака, не кодируют функциональные ферменты никотиндеметилазы (Siminszky и др., 2005; Chakrabarti и др., 2007; Dewey и др., 2007; Gavilano и др., 2007; Xu и др., 2007a). Таким образом, только степень гомологии последовательностей является не очень точным индикатором функции генов семейства *CYP82E*. Вместо этого анализ экспрессии либо в трансгенных растениях (Siminszky и др., 2005), либо в дрожжах (Gavilano и Siminszky, 2007; Xu и др., 2007a) представляет собой признанное средство решения вопроса о том, кодируют ли индивидуальные представители этого семейства генов никотиндеметилазную активность.

Для решения вопроса о том, функционирует ли *CYP82E10* в качестве гена никотиндеметилазы, его кДНК клонировали в дрожжевом экспрессионном векторе pYeDP60 и трансформировали им штамм дрожжей W(R). Штамм W(R) представляет собой клеточную линию дрожжей, которая была сконструирована с целью сверхэкспрессии дрожжевой НАДФ·Н-зависимой P450-редуктазы, фермента, который служит в качестве непосредственного донора электронов для P450; эта система позволяет в значительной степени повышать уровень выявления активности чужеродного фермента P450, экспрессируемого в дрожжах (Romero и др., 1995). Анализы никотиндеметилазы осуществляли путем инкубации препаратов микросомальных мембран дрожжей с [¹⁴C]-никотином и разделения продуктов с помощью тонкослойной хроматографии, согласно методу, описанному у Siminszky и др., 2005.

Как показано на фиг. 3, никакой никотиндеметилазной активности не удалось обнаружить при использовании микросом дрожжей штамма W(R), экспрессирующих только вектор pYeDP60. В противоположность этому выраженную никотиндеметилазную активность удалось обнаружить при оценке микросом, полученных из дрожжевых клеток, которые экспрессировали кДНК *CYP82E10*. Путем измерения ферментативной активности фермента *CYP82E10* с использованием широкого спектра концентраций [¹⁴C]-никотина создавали кривую насыщения субстратом и с использованием анализа микросом было рассчитано кажущееся значение K_m , составлявшее 3,9 мкМ. Этот кинетический

параметр для CYP82E10 очень близок к значениям K_m , опубликованным для ферментов CYP82E4v2 и CYP82E5v2 при их аналогичной экспрессии в дрожжах (Gavilano и др., 2007; Gavilano и Siminszky, 2007; Xu и др., 2007a).

Пример 2: Идентификация растений, несущих мутантные аллели CYP82E10

5 Для точной оценки специфического вклада CYP82E10 в общий уровень норникотина в растении табака необходимо: (1) идентифицировать растение табака, в гене которого присутствует приводящая к «выключению» мутация; и (2) объединить эту мутацию с мутациями *cyp82e4v2* и *cyp82e5v2*, полученными из растений 775 и 1013 соответственно. Для идентификации потенциально
10 ослабляющих мутаций в гене CYP82E10 подвергали скринингу популяцию DN98-325-6, для обработки которой в качестве мутагена применяли ЭМС, для чего проводили широкомасштабный анализ последовательностей ДНК с использованием праймеров, которые обеспечивают специфическую амплификацию участков CYP82E10 (без одновременной амплификации других
15 представителей суперсемейства CYP82E). Для специфической амплификации экзона 1 CYP82E10 применяли следующие ПЦР-праймеры: 5'-GTGATAGTTTGATTCCCAAGTGC-3' («прямой») и 5'-СТССАААГТТАГАТТАГТССГ-3' («обратный»); для специфической амплификации экзона 2 применяли праймеры 5'-AGGTCGCGCTGATTCTTG-3'
20 («прямой») и 5'-AGATGAАТАССАТСТАТСТАГГАГТ-3' («обратный»). Для гарантии максимальной специфичности «обратный» праймер для экзона 1 и «прямой» праймер для экзона 2 соответствовали последовательностям в интроне CYP82E10 (фиг. 1). ПЦР-амплификацию и анализ последовательностей мутантных растений осуществлял в 96-луночном формате согласно методу,
25 описанному у Dewey и др., 2007.

Широкомасштабный анализ последовательностей свыше 1200 особей из мутантной популяции табака позволил идентифицировать 15 особей, несущих мутации в CYP82E10. Наиболее значимые из них представлены в таблице 2. Кроме того, на фиг. 1 выделены подчеркиванием измененные в результате
30 мутации нуклеотиды и аминокислотные остатки в этих растениях. Хотя в этих особях не обнаружены укорачивающие мутации, в нескольких случаях идентифицированы мутации, которые изменяют аминокислотный остаток в высококонсервативной области фермента. Для определения воздействий

конкретной мутации на активность фермента CYP82E10 применяли сайтнаправленный мутагенез для интродукции специфических мутаций, которые соответствовали семи из девяти мутаций, представленных в таблице 2, в кДНК CYP82E10 в дрожжевом экспрессионном векторе pYeDP60. Препараты микросом из штаммов дрожжей, экспрессирующих каждый из семи вариантов CYP82E10, анализировали *in vitro* в отношении никотиндеметиلاзной активности при использовании как ненасыщающей (2,45мкМ), так и насыщающей (50мкМ) концентрации [¹⁴C]-никотина. Результаты, полученные на основе анализов экспрессии в дрожжах, продемонстрировали, что мутации, обнаруженные в растениях 693, 817 и 1035, не изменяли ферментативную активность, а мутации, обнаруженные в растениях 1041, 1512 и 2476, приводили к полной инактивации фермента. Мутация, обнаруженная в растении 1442, приводила к снижению активности на 75% по сравнению с активностью фермента CYP82E10 дикого типа.

Полученные с помощью тонкослойной хроматографии данные анализов *in vitro*, касающиеся экспрессии в дрожжах при наличии соответствующей мутации в растении 1041, представлены на фиг. 3. Указанная конкретная мутация была выбрана для более подробного изучения. Для дополнительного подтверждения того, что замена аминокислоты Pro на Ser в положении 382, которая соответствует мутации растения 1041, не совместима с функцией деметилирования никотина, именно эту мутацию интродуцировали в кДНК CYP82E4v2, которую клонировали аналогичным образом в векторе pYeDP60. Результаты анализов этих дрожжей представлены в таблице 3. Замена на Ser Pro в положении 382, если она присутствовала в ферменте CYP82E10 или CYP82E4v2, приводила к полной элиминации никотиндеметилазной активности в этом анализе. Важно отметить, что хотя активность ферментов CYP82E10 и CYP82E4v2 дикого типа была сопоставима при использовании [¹⁴C]-никотина в ненасыщающей концентрации (2,45мкМ), при применении субстрата в концентрации 25мкМ уровень синтеза [¹⁴C]-норникотина был примерно в три раза выше в препаратах микросом, содержащих фермент CYP82E10, чем в препаратах, содержащих CYP82E4v2.

Таблица 2. Обработанные ЭМС линии DN98-325-6, несущие мутации в гене *CYP82E10*

Номер растения	Мутация ^а	Аминокислотная замена	Активность мутантного фермента ^б
2476	G235A	G79S	не выявлена
1512	C319T	P107S	не выявлена
319	C442T	L148F	не тестировали
634	G514A	G172R	не тестировали
1035	G1030A	A344T	100%
1041	C1141T	P382S	не выявлена
817	G1228A	A410T	100%
693	G1250A	R417H	100%
1442	C1255T	P419S	25%

^а Нумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК

5 *CYP82E10*.

^б Относительно активности фермента дикого типа при экспрессии в дрожжах.

Таблица 3. Никотиндеметиلاзная активность ферментов *CYP82E4v2* и *CYP82E10*, несущих мутацию 1041 (Pro382Ser)

Вектор	СРМ норникотина при использовании в качестве субстрата 2,45мкМ [¹⁴ C]-никотина	СРМ норникотина при использовании в качестве субстрата 50,0мкМ [¹⁴ C]-никотина
pYeDP60-CYPE4v2	1,813±623 ^б	5,383±505
pYeDP60-CYPE4v2/1041	не выявлено	не выявлено
pYeDP60-CYPE10	2,296±99	15,253±465
pYeDP60-CYPE10/1041	не выявлено	не выявлено

10 ^аКоличество импульсов в мин [¹⁴C]-норникотина/мг микросомального белка.

^бСтандартное отклонение, полученное при применении двух технических повторностей.

15 Никотиндеметилазную активность клеток дрожжей, экспрессирующих *CYP82E10* дикого типа и мутант 1041, анализировали также *in vivo*. Культуры дрожжей встряхивали в течение ночи в присутствии 55мкМ [¹⁴C]-никотина, экстрагировали метанолом и анализировали с помощью тонкослойной хроматографии. [¹⁴C]-Норникотин был обнаружен в экстрактах дрожжей, экспрессирующих *CYP82E10* дикого типа, но он не был обнаружен в мутантной

версии 1041 гена (данные не представлены). В целом, анализ экспрессии в дрожжах позволил предположить, что функция фермента CYP82E10 с большой вероятностью полностью элиминируется при интродукции мутации 1041.

Пример 3: Объединение мутантных аллелей *cyp82e10*, *cyp82e4v2* и *cyp82e5v2*

5 С учетом того, что исходная мутация 1041 присутствует в генетическом фоне (DN98-325-6), который соответствует как аллелю сильного конвертера CYP82E4v2, так и гену CYP82E5v2 дикого типа, единственный путь точного анализа специфического вклада CYP82E10 в общее содержание норникотина в
10 растении, предусматривал интродукцию мутации 1041 в растения табака, которые несли также приводящие к «выключению» мутации CYP82E4v2 и CYP82E5v2. Для этой цели растения, гетерозиготные по мутации 1041 (*e10E10*), скрещивали с растениями, гетерозиготными по обоим описанным выше мутациям 775 и 1013 (*e4E4/e5E5*). Последние растения представляли собой
15 потомков, полученных после скрещивания 775/1013//TN90/3/TN90/4/TN90. Растения поколения F₁, гетерозиготные по всем трем мутациям никотиндеметираз (*e4E4/e5E5/el0E10*), идентифицировали путем молекулярного генотипирования и давали самоопыляться. Молекулярное генотипирование применяли также для скрининга свыше 400 растений поколения F₂ и затем
20 группировали их в следующие генотипические классы: *E4E4/E5E5/el0el0* (всего 3 растения); *e4e4/E5E5/el0el0* (всего 4 растения); *E4E4/e5e5/el0el0* (всего 5 растений) и *e4e4/e5e5/el0el0* (всего 5 растений).

Все указанные выше растения пересаживали и выращивали в полевых условиях на исследовательской станции Upper Coastal Plains в г. Роки-Маунт,
25 шт. Северная Каролина летом 2009 г. В этом опыт включали также два из тестированных в полевом опыте, проведенных в 2008 г., генотипов, которые представлены в таблице 1. В частности, для сравнения в опыт включали десять растений DN98-325-6, гомозиготных только по мутации *cyp82e4v2* (*e4e4/E5E5/E10E10*), и одиннадцать растений DN98-325-6, имеющих генотип, гомозиготный по двум мутациям *e4e4/e5e5/E10E10*. В опыт включали также в
30 качестве контролей отдельные растения, произвольно отобранные из лота поступающих в продажу семян «слабого конвертера» (TN90LC), особи DN98-325-6 дикого типа и растения из наиболее эффективных трансгенных линий, у

5 которых для подавления *CYP82E4v2* использовали РНКi. После достижения растениями высоты в среднем 30 см (35 дней после пересадки) собирали листья, одинаково расположенные на стебле, обрабатывали этаноном и сушили на воздухе согласно протоколу, разработанному Jack и др., 2007. Содержание алкалоидов высушенного листового материала определяли с помощью газовой хроматографии согласно указанному протоколу.

В таблице 4 и на фиг. 4 представлены результаты анализа алкалоидов, полученные при проведении полевого опыта в 2009 г. В соответствии с полученными ранее данными индивидуальная вызывающая «выключение» мутация *sup82e4v2* оказывала отрицательное воздействие на фенотип сильного конвертера линии DN98-325-6, а также приводила к проявлению фенотипа, отличающегося существенно более низким уровнем накопления норникотина по сравнению с растениями, выращенными из поступающих в продажу семян TN90LC (уровень превращения 2,2% по сравнению с 7,1% соответственно). Как установлено в полевом опыте, проведенном в 2008 г. (таблица 1), объединение мутации *sup82e5v2* с мутацией *sup82e4v2* не приводило к дальнейшему снижению содержания норникотина. Так, средний уровень превращения в растениях генотипа *e4e4/E5E5/E1 0E10* был фактически ниже по сравнению с уровнем превращения в особях генотипа *e4e4/e5e5/E10E10* (2,2% по сравнению с 2,3%), однако указанное небольшое различие оказалось статистически незначимым. Как и ожидалось, мутация *sup82e10* не влияла на высокий уровень норникотина, обусловленный активным геном *CYP82E4v2*, либо индивидуально (генотипы *E4E4/E5E5/e10e10*), либо в сочетании с мутантным аллелем *sup82e5v2* (генотипы *E4E4/e5e5/e10e10*) (фиг. 4А). Аналогично результатам, полученным для двойного мутанта *sup82e4v2* и *sup82e5v2* (таблицы 1 и 4), интродукция *sup82e10* в генетический фон *sup82e4v2* не обладала эффективностью в отношении снижения уровней норникотина по сравнению с уровнями, которые достигались при наличии только мутации *sup82e4v2* (фиг. 4Б). Для генотипов *e4e4/E5E5/e10e10* характерно превращение в среднем 1,85%, что статистически незначимо отличалось от среднего уровня превращения 2,2%, обнаруженного для особей, имеющих генотип *e4e4/E5E5/E10E10* ($P = 0,235$).

Таблица 4. Профили алкалоидов в экспериментальном материале, которые оценивали в полевом опыте в 2009 г. Для оценки использовали листья, собранные через 35 дней после пересадки. Величины, выраженные в процентах, представляют собой средние значения.

Генотип	Ген-мишень	Мутация ^б	Аминокислотная замена	Содержание никотина ^в (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения ^г
DN98-325-6 контроль (8) ^а	контроль	-	-	0,133	1,553	0,009	0,085	92,21
TN90LC (11)	контроль	-	-	1,519	0,104	0,002	0,065	7,15
DN98-325-6 РНКi 300-02 №1 (10)	<i>CYP82E4v2</i> и родственные гены	-	-	1,747	0,009	0,003	0,063	0,64
DN98-325-6 №775 гомозиготный (10)	<i>CYP82E4v2</i>	G986A	W329Stop	1,375	0,030	0,0002	0,057	2,20
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (11)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E5v2</i>	двойная	двойная	1,524	0,036	0,003	0,084	2,34
DN980325-6 №1041 гомозиготный (3)	<i>CYP82E10</i>	C1141T	P382S	0,082	1,302	0,007	0,073	93,87
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (5)	<i>CYP82E5v2</i> <i>CYP82E10</i>	двойная	двойная	0,081	1,345	0,010	0,068	94,31
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (4)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E101</i>	двойная	двойная	2,168	0,045	0,004	0,087	1,85
DN98-325-6 двойной гомозиготный мутант (5)	<i>CYP82E4v2</i> <i>CYP82E5v2</i> <i>CYP82E10</i>	тройная	тройная	1,793	0,012	0,003	0,056	0,055

5 ^аЧисла в скобках обозначают общее количество проанализированных растений.

^бНумерация относительно стартового кодона последовательности кДНК.

^вПроценты рассчитывали на основе сухой массы табака.

^г Процент превращения никотина определяли из уравнения $[\% \text{ норникотина} / (\% \text{ норникотина} + \% \text{ никотина})] \times 100$.

Хотя мутации *сур82е5v2* и *сур82еl0* не приводили к значимому снижению содержания норникотина в несущих *сур82е4v2* растениях, при объединении индивидуальных мутаций наличие всех трех мутаций никотиндеметираз оказывало заметное действие. Превращение никотина в норникотин в несущих три мутации растениях (*е4е4/е5е5/еl0еl0*) составляло в среднем только 0,55%, т.е. процент фактически идентичен 0,54%, обнаруженному в трансгенной линии, полученной путем подавления с помощью РНКi ($P = 0,893$; фиг. 4Б). Это представляет собой практически 3-кратное снижение превращения никотина по сравнению со снижением, опосредуемой только мутацией *сур82е4v2*. Различия в проценте превращения никотина (и накоплении норникотина в процентах в пересчете на общую сухую массу) между генотипами *е4е4/Е5Е5/Е10Е10* и *е4е4/е5е5/еl0еl0* оказалось статистически высокозначимыми ($P < 0,0001$). Аналогично результатам, полученным в исследовании опосредуемого РНКi-подавления превращения никотина (Lewis и др., 2008), не является очевидным, что наличие нетрансгенного изменения активности никотиндеметираз в растении табака, может приводить к существенному изменению содержания минорных видов алкалоидов анатабина и анабазина.

Влияние одновременного присутствия трех независимых мутаций генов никотиндеметираз тестировали также в полевом опыте, проведенном в вегетационный сезон в 2010 г. Для этого исследования осуществляли скрещивание полного генетического фона ДН98-325-6 (от отличии от опыта, проведенного в 2009 г., в котором применяли также в качестве родителя TN90). И в этом исследовании применяли молекулярное генотипирование для создания каждой из возможных комбинаций, необходимых для определения относительного вклада каждого локуса *СУР82Е* в фенотип, касающийся норникотина. Получали данные о профилях алкалоидов в растениях табака, которые выращивали до стадии созревания и сушили согласно стандартной промышленной практике. Как видно из таблицы 5, высокой уровень превращения никотина (составляющий от 52,4 до 65,59%) обнаружен во всех генотипах, гомозиготных по гену *СУР82Е4v2* дикого типа (генотипы *Е4Е4/Е5Е5/Е10Е10*, *Е4Е4/е5е5/Е10Е10*, *Е4Е4/Е5Е5lеl0еl0* и *Е4Е4/е5е5/еl0еl0*). В растениях, гомозиготных только по мутации *сур82е4v2* (*е4е4/Е5Е5/Е10Е10*), средний уровень превращения никотина в норникотин составлял 2,91%.

Аналогично результатам, полученным в 2009 г., установлено, что воздействие мутаций *сур82E5v2* и *сур82E10* не было аддитивным и проявлялось только в случае, когда все три мутантных локуса накапливались вместе. В растениях ДН98-325-6 (*e4e4/E5E5/el0el0*) средние уровни превращения составляли 2,89%, и в особях ДН98-325-6 (*e4e4/e5e5/E10E10*) средние уровни превращения составляли 2,52%, т.е. эти значения не отличались статистически достоверно от уровней, обнаруженных при наличии только мутации *сур82e4v2*. В противоположность этому, снижение уровня норникотина, обнаруженное в растениях с включающим три мутации генотипом ДН98-325-6 (*e4e4/e5e5/el0el0*) (уровень превращения никотина 1,11%) оказался в 2,6 раз ниже по сравнению с уровнем, обусловленным присутствием только мутации *сур82e4v2*. Снижение уровня превращения никотина, связанное с наличие комбинации трех мутаций, оказалось статистически высоко значимым ($P < 0,001$) по сравнению с присутствием как только мутации *сур82e4v2*, так и комбинации двух мутаций.

Таблица 5. Профили алкалоидов для генотипов DN98-325-6, несущих различные комбинации мутаций в локусах *CYP82E4v2* (*E4*), *CYP82E5* (*E5*) и *CYP82E10* (*E10*). Данные представляют собой средние значения, полученные по пяти повторностям, и полученные с помощью анализа смеси, содержащей измельченные образцы четвертого и пятого листа, взятых с верхушки растения

Генотип	Содержание никотина (%)	Содержание норникотина (%)	Содержание анабазина (%)	Содержание анатабина (%)	% превращения
DN98-325-6 <i>E4E4 E5E5 E10E10</i>	1,76	2,46	0,02	0,17	58,66
DN98-325-6 <i>e4e4 E5E5 E10E10</i>	2,61	0,08	0,01	0,09	2,91
DN98-325-6 <i>E4E4 e5e5 E10E10</i>	1,08	2,06	0,02	0,14	65,59
DN98-325-6 <i>E4E4 E5E5 e10e10</i>	1,40	1,96	0,01	0,13	59,30
DN98-325-6 <i>e4e4 e5e5 E10E10</i>	3,25	0,09	0,02	0,16	2,89
DN98-325-6 <i>e4e4 E5E5 e10e10</i>	3,59	0,09	0,01	0,12	2,52
DN98-325-6 <i>E4E4 e5e5 e10e10</i>	1,59	1,72	0,01	0,09	52,40
DN98-325-6 <i>e4e4 e5e5 e10e10</i>	4,18	0,05	0,02	0,13	1,11

5

Процентное содержание алкалоидов рассчитывали на основе сухой массы. Процент превращения никотина определен из уравнения: $[\% \text{ норникотина} / (\% \text{ норникотина} + \% \text{ никотина})] \times 100$.

Заключение

На основе представленного и охарактеризованного в настоящем описании нового гена никотиндеметилазы, *CYP82E10*, оказалось возможным разработать стратегию снижения уровней превращения никотина (и, как следствие, снижения 5 уровней норникотина) в листьях имеющих коммерческое значения высушенных на воздухе растений табака до уровней, которые ранее можно было получать только с использованием подходов, основанных на применении трансгенов. Такая не основанная на применении ГМО технология может обеспечивать снижение уровней норникотина до уровня, близкого к уровню, который 10 достигался с помощью основанных на применении трансгенов стратегий, при этом она обладает очень большим преимуществом, поскольку открывает пути создания сортов табака с ультранизким содержанием норникотина, обходя при этом значительные барьеры, ассоциированные с коммерциализацией трансгенных культур, такие как: (1) переговоры и оплата лицензионных пошлин за некоторые разрешенные технологии, требуемые для создания трансгенных 15 растений; (2) необходимость избегать больших временных и обременительных материальных затрат, ассоциированных с нарушением регуляции трансгенных случаев; и (3) возможность получения отказа от продукта конечными потребителями, жизненная философия которых не допускает применение ГМО. 20 Исследование, представленное в настоящем описании, представляет собой очень значительное достижение с позиций возможности снижения уровней одного из наиболее хорошо известных сильных карциногенов, обнаруженного в табачных изделиях, по сравнению с описанными ранее стратегиями, не основанными на использовании ГМО, направленными на интродукцию мутаций только в ген 25 *CYP82E4v2* никотиндеметилазы (Julio и др., 2008; Xu и др., 2007б) или объединенных мутаций *CYP82E4v2* и *CYP82E5v2* (Dewey и др., 2007). С помощью трансгенных технологий ранее продемонстрировано, что снижение уровней превращения никотина с ~2,6% до ~0,5% в высушенных листьях приводит также к соответственному снижению NNN в листьях (Lewis и др., 30 2008). Следует ожидать также аналогичного снижения содержания NNN в листьях табака, содержащих комбинацию трех мутаций (*e4e4/e5e5/el0el0*), представленную в настоящем описании. Хотя эта технология исходно была разработана для табака, предназначенного для сушки на воздухе, ее с успехом

можно применять для сортов, которые предназначены для сушки на пару. По мере старения теплообменников их способность удалять газы NO_x в процессе сушки на пару может снижаться. Кроме того, в современных исследованиях установлено, что при хранении высушенных листьев может происходить образование значительных количеств TSNA. Минимизация уровней норникотина посредством интродукции комбинации трех мутантов в сорта, предназначенные для сушки на пару, может являться средством защиты от образования NNN либо в процессе хранения, либо в результате неэффективного теплообмена в процессе сушки.

10 Ссылки

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. и Lipman D.J., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. и Lipman D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res 25, 1997, сс. 3389-3402.

Brogan A.P., Dickerson T.J., Boldt G.E. и Janda K.D., Altered retinoid homeostasis catalyzed by nicotine metabolite: implications in macular degeneration and normal development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 10433-10438.

Boyette M.D. и Hamm L.A., Results of year 2000 TSNA sampling program in flue-cured tobacco, Rec. Adv. Tob. Sci. 27, 2001, сс. 17-22.

Bush L.P., Cui M., Shi PL, Burton H.R., Fannin F.F., Lei L. и Dye N., Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco, Rec. Adv. Tob. Sci. 27, 2001, сс. 23-46.

Chakrabarti M., Meekins K.M., Gavilano L.B. и Siminszky B., Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco, New Phytol. 175, 2007, сс. 565-574.

Dewey R.E., Siminszky B., Bowen S.W. и Gavilano L., Alteration of tobacco alkaloid content through modification of specific cytochrome P450 genes, заявка на патент США 60/987243, 2007.

Dickerson T.J. и Janda K.D., A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2002, сс. 15084-15088.

Gavilano L.B., Coleman N.P., Bowen S.W. и Siminszky B., Functional analysis of nicotine demethylase genes reveals insights into the evolution of modern tobacco, *J. Biol. Chem.* 282, 2007, сс. 249-256.

5 Gavilano L.B. и Siminszky B., Isolation and characterization of the cytochrome P450 gene CYP82E5v2 that mediates nicotine to nornicotine conversion in the green leaves of tobacco, *Plant Cell Physiol.* 48, 2007, сс. 1567-1574.

Hecht S.S., Biochemistry, biology and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1998, сс. 559-603.

10 Hecht S.S., Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, *Nature Rev.* 3, 2003, сс. 733-744.

Hecht S.S. и Hoffmann D., The relevance of tobacco specific nitrosamines to human cancer, *Cancer Surveys* 8, 1990, сс. 273-294.

15 Hoffmann D., Brunnemann K.D., Prokopczyk B. и Djordjevic M.V., Tobacco-specific N-nitros amines and Areca-derived N-nitrosamine chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans, *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 1994, сс. 1-52.

Jack A., Fannin N. и Bush L.P., Implications of reducing nornicotine accumulation in burley tobacco: Appendix A - The LC Protocol. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 33, 2007, сс. 58-79.

20 Julio E., Laporte F., Reis S., Rothan C. и Dorlhac de Borne F., Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding, *Mol. Breed.* 21, 2008, сс. 369-381.

25 Katz J., Caudle R.M., Bhattacharyya I., Stewart CM. и Cohen D.M., Receptor for advanced glycation end product (RAGE) upregulation in human gingival fibroblasts incubated with nornicotine, *J. Periodontal.* 76, 2005, сс. 1171-1174.

Lewis R.S., Jack A.M., Morris J.W., Robert V.J.M., Gavilano L., Siminszky B., Bush L.P., Hayes A.J. и Dewey R.E., RNAi-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves, *Plant Biotech. J.* 6, 2008, сс. 346-354.

30 Peele D.M. и Gentry J.S., Formation of tobacco-specific nitrosamines in flue-cured tobacco, COPvESTA Meeting, Agro-Phyto Groups, Suzhou, China, 1999.

Pompon D., Louerat B., Bronne A. и Urban P., Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments, *Methods Enzymol.* 272, 1995, сс. 51-64.

5 Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W. и Dewey R.E., Conversion of nicotine to nor nicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2005, сс. 14919-14924.

Wernsman E.A. и Matzinger D.F., Time and site of nicotine conversion in tobacco, *Tob. Sci.* 12, 1968, сс. 226-228.

10 Xu D., Shen Y., Chappell J., Cui M. и Nielsen M., Biochemical and molecular characterization of nicotine demethylase in tobacco, *Physiol. Plantarum* 129, 2007a, сс. 307-319.

Xu D., Nielsen M.T. и Shen Y., Tobacco plants having a mutation in a nicotine demethylase gene, заявка на патент США 20070199097, 2007b.

15 Целый ряд модификаций и других вариантов осуществления представленного в настоящем описании изобретения должны стать очевидными для специалиста в области, к которой относится данное изобретение, после ознакомления с его преимуществами, изложенными в приведенном выше описании, и прилагаемыми чертежами. Таким образом, следует понимать, что объем изобретения не ограничен конкретными представленными в настоящем описании вариантами изобретения и под объем перечисленных вариантов осуществления изобретения и прилагаемой формулы изобретения подпадают также модификации и другие варианты осуществления изобретения. Хотя в настоящем описании использованы конкретные понятия, они применяются
20 только в их общем и описательном смысле и не направлены на ограничение объема изобретения.
25

Все процитированные в описании публикации и заявки на патент отражают уровень техники, известный специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в настоящее описание в качестве ссылки в той же самой степени, как если бы было
30 указано, что каждая индивидуальная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально включена в качестве ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> НОРТ КАРОЛИНА СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ

5 <120> Композиции и способы, предназначенные для минимизации синтеза никотина в растениях табака

<130> 035051/400712

10

<150> 61/295,671

<151> 2010-01-15

<160> 40

15

<170> FastSEQ для версии 4.0 Windows

<210> 1

<211> 1551

20

<212> ДНК

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)...(1551)

<223> Кодировать никотиндеметилазу CYP82E10

<400> 1

atg gtt tct ccc gta gaa gcc atc gta gga cta gta act ctt aca ctt 48

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu

30

1 5 10 15

ctc ttc tac ttc ata cgg acc aaa aaa tct caa aaa cct tca aaa cca 96

Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro

20 25 30

35

tta cca ccg aaa atc ccc gga ggg tgg ccg gta atc ggc cat ctt ttc 144

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe

35 40 45

40

tat ttc gat gac gac agc gac gac cgt cca tta gca cga aaa ctc gga 192

Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly

50 55 60

45

gac tta gct gac aaa tac ggc ccg gtt ttc act ttt cgg cta ggc ctt 240

Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu

65 70 75 80

ccg ctt gtg tta gtt gta agc agt tac gaa gct ata aaa gac tgc ttc 288
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
85 90 95

5 tct aca aat gat gcc att ttc tcc aat cgt cca gct ttt ctt tat ggc 336
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110

10 gaa tac ctt ggc tac aat aat gcc atg cta ttt ttg aca aaa tac gga 384
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125

15 cct tac tgg cga aaa aat aga aaa tta gtc att cag gaa gtt ctc tgt 432
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140

20 gct agt cgt ctc gaa aaa ttg aag cac gtg aga ttt ggt gaa att cag 480
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160

acg agc att aag aat tta tac act cga att gat gga aat tcg agt acg 528
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

25 ata aat cta acc gat tgg tta gaa gaa ttg aat ttt ggt ctg atc gtg 576
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

30 aaa atg atc gct ggg aaa aat tat gaa tcc ggt aaa gga gat gaa caa 624
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

35 gtg gag aga ttt agg aaa gcg ttt aag gat ttt ata att tta tca atg 672
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220

40 gag ttt gtg tta tgg gat gct ttt cca att cca ttg ttc aaa tgg gtg 720
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240

gat ttt caa ggc cat gtt aag gcc atg aaa agg aca ttt aag gat ata 768
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255

45 gat tct gtt ttt cag aat tgg tta gag gaa cat gtc aag aaa aaa gaa 816
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270

aaa atg gag gtt aat gca gaa gga aat gaa caa gat ttc att gat gtg 864
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285

5
gtg ctt tca aaa atg agt aat gaa tat ctt gat gaa ggc tac tct cgt 912
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300

10
gat act gtc ata aaa gca aca gtg ttt agt tta gtc ttg gat gct gcg 960
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320

15
gac aca gtt gct ctt cac atg aat tgg gga atg gca tta ttg ata aac 1008
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335

20
aat caa cat gcc ttg aag aaa gcg caa gaa gag ata gat aaa aaa gtt 1056
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350

25
ggg aag gat aga tgg gta gaa gag agt gat att aag gat ttg gta tac 1104
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365

30
ctc caa act att gtt aaa gaa gtg tta cga tta tat cca ccg gga cct 1152
Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380

35
tta tta gta ccc cat gaa aat gta gag gat tgt gtt gtt agt gga tat 1200
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400

40
cac att cct aaa ggg act aga cta ttc gcg aac gtt atg aaa tta cag 1248
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415

45
cgc gat cct aaa ctc tgg tca aat cct gat aag ttc gat cca gag aga 1296
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430

50
ttt ttc gct gct gat att gac ttt cgt ggt caa cac tat gag ttt atc 1344
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445

55
cca ttt ggt tct gga aga cga tct tgt ccg ggg atg act tat gca atg 1392
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
5 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
10 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
15 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
20 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
25 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
30 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445
35 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
40 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
500 505 510
Thr Pro Glu Leu Tyr
515
45

<211> 818
<212> ДНК
<213> *Nictioiana tabacum*

5 <220>
<221> интрон
<222> (1)...(818)
<223> Интрон гена CYP82E10

10 <400> 3
gtaagttcat ctcatttttc atttattcct tgaggaatag acaggttaat agtaatttaa 60
gtaattagat tatctaaata ctaaggatga gtaaatatgg caaaaatata gaatgataaa 120
tggaaaaagga tgataatttt ttatgcccg actaatctaa ctttgggagt taaagcactt 180
cctaccaata gggacttttc ttcaagctcg atcttgatga aactctgtgg ttaaaaaaat 240
15 gagatatan caattataat tgatagaata aaactttatt actcccattg agcataacaa 300
aacaaaaaaa agtaaaggga cttcttctct tttttaggga gaaattcttt gattgtttgt 360
taatatagat tcatgttttt ttttatttct aataataatt gtgcttgaat caggctcgcg 420
tgattcttgg ctttttagca gcaatagagt caaagcta atacatatta tttggttttc 480
gaataagtta tactgaaatt atataatagc ggtattaaat aataacatga ttatttatag 540
20 gatatgcttt ttttattggg taaatatatt ttttttaatt aaaaatgaaa tatacaagta 600
aggtataaaa cactatttga ttttactacta gataaatttg ccctcgta tctctaagag 660
aagagctgaa ataaatgaat tttaaatttc agaaaaaat aaattcatta gtataatgag 720
atgtcgatac ttgacaatta ctatactaac tagaacaagg ttcagcagat agtgacgcta 780
acctattttt gtattgaatt attctaattt gtccacag 818

25 <210> 4
<211> 2636
<212> ДНК
<213> *Nicotiana tabacum*

30 <220>
<221> 5'UTR
<222> (1)...(114)
<223> 5' UTR CYP82E10

35 <220>
<221> экзон
<222> (115)...(1053)
<223> Последовательность экзона 1 CYP82E10
<220>

40 <221> интрон
<222> (1054)...(1871)
<223> Последовательность интрона CYP82E10
<220>

45 <221> экзон
<222> (1872)...(2483)
<223> Последовательность экзона 2 CYP82E10
<220>

<221> 3'UTR
<222> (2484)...(2636)
<223> 3' UTR CYP82E10
<400> 4

5 ttttcaattt ttgttacttt tgtatattat atattattat gcatagccct aaattatcta 60
taaaagggaa gttggtgata gtttgattcc caagtgcttt tctaaaaatc cataatgggt 120
tctcccgtag aagccatcgt aggactagta actcttacac ttctcttcta ctccatacgg 180
acaaaaaat ctcaaaaacc ttcaaaacca ttaccaccga aaatccccgg aggggtggccg 240
gtaatcggcc atcttttcta tttcgatgac gacagcgacg accgtccatt agcacgaaaa 300
10 ctcgagact tagctgacaa atacggcccg gttttcactt ttcggctagg ccttccgctt 360
gtgtaggtt taagcagtta cgaagctata aaagactgct tctctacaaa tgatgccatt 420
ttctccaate gtccagcttt tctttatggc gaataccttg gctacaataa tgccatgcta 480
tttttgacaa aatacggacc ttactggcga aaaaatagaa aattagtcatt tcaggaagtt 540
ctctgtgcta gtcgtctcga aaaattgaag cacgtgagat ttggtgaaat tcagacgagc 600
15 attagaatt tatacactcg aattgatgga aattcgagta cgataaatct aaccgattgg 660
ttagaagaat tgaattttgg tctgatcgtg aaaatgatcg ctgggaaaaa ttatgaatcc 720
ggtaaaggag atgaacaagt ggagagattt aggaaagcgt ttaaggattt tataatttta 780
tcaatggagt ttgtgttatg ggatgctttt ccaattccat tgttcaaatg ggtggatttt 840
caaggccatg ttaaggccat gaaaaggaca ttttaaggata tagattctgt ttttcagaat 900
20 tggtagagg aacatgtcaa gaaaaagaa aaaatggagg ttaatgcaga aggaaatgaa 960
caagatttca ttgatgtggt gctttcaaaa atgagtaatg aatatcttga tgaaggctac 1020
tctcgtgata ctgtcataaa agcaacagtg tttgtaagtt catctcattt ttcatttatt 1080
ctttgaggaa tagacagggt aatagtaatt taagtaatta gattatctaa atactaagga 1140
tgagtaaata tggcaaaaat atagaatgat aaatggaaaa ggatgataat tttttatgcc 1200
25 cggactaatc taactttggg agttaaagca ctctctacca atagggactt ttcttcaagc 1260
tcgatcttga tgaactctg tggttaaaaa aatgagatat anccaattat aattgataga 1320
ataaaaacttt attactccca ttgagcataa caaaacaaaa aaaagtaaag ggacttcttc 1380
tcttttttag ggagaaattc tttgattggt tgtaaatata gattcatggt tttttttatt 1440
tctaataata attgtgcttg aatcaggctg cgctgattct tggcttttta gcagcaatag 1500
30 agtcaaagct aatatacata ttatttgggt ttcgaataag ttatactgaa attatataat 1560
acgggtatta aataataaca tgattattta taggatatgc tttttttatt gggtaaatat 1620
atftttttta attaaaaatg aaatatacaa gtaaggataa aaacactatt tgattttaca 1680
ctagataaat ttgcctcgt acatctctaa gagaagagct gaataaatg aattttaaat 1740
ttcagaaaaa aataaattca ttagtataat gagatgtcga tacttgacaa ttactatact 1800
35 aactagaaca aggttcagca gatagtgacg ctaacctatt tttgtattga attattctaa 1860
tttgtccaca gagtttagtc ttggatgctg cggacacagt tgctcttcac atgaattggg 1920
gaatggcatt attgataaac aatcaacatg ccttgaagaa agcgcaagaa gagatagata 1980
aaaaagttgg taaggataga tgggtagaag agagtgatat taaggatttg gtatacctcc 2040
aaactattgt taaagaagtg ttacgattat atccaccggg acctttatta gtaccccatg 2100
40 aaaatgtaga ggattgtggt gttagtggat atcacattcc taaagggact agactattcg 2160
cgaacgttat gaaattacag cgcgatccta aactctggtc aaatcctgat aagttcgatc 2220
cagagagatt tttcgctgct gatattgact ttcgtggtea acactatgag tttatcccat 2280
ttggttctgg aagacgatct tgtccgggga tgacttatgc aatgcaagtg gaacacctaa 2340
caatcgcaca cttgatccag ggtttcaatt acaaaaactcc aatgacgag cccttgata 2400
45 tgaagggaag tgcaggatta actatacgtg aggtaaatec tatagaagtg gtaattacgc 2460
ctcgcctgac acctgagctt tattaaaate taagatgttt tatcttgggt gatcattggt 2520
taatactcct agatagatgg gtattcatct atctttttaa aattaattgt cagtacgagt 2580

gttttctaatt tggtaagttt gtaacaacaa gtaaagaagg attgtgctag tatgta 2636

<210> 5

<211> 517

5 <212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

10 <222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E10 L148F

<400> 5

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15

15 Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45

20 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60

Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80

Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
85 90 95

25 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110

Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125

30 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140

Ala Ser Arg Phe Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160

Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

35 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

40 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220

Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240

Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255

45 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270

Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val

	275							280								285
	Val	Leu	Ser	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg
	290						295					300				
5	Asp	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala
	305					310					315					320
	Asp	Thr	Val	Ala	Leu	His	Met	Asn	Trp	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn
					325					330						335
	Asn	Gln	His	Ala	Leu	Lys	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Lys	Lys	Val
				340					345							350
10	Gly	Lys	Asp	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr
			355						360							365
	Leu	Gln	Thr	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Gly	Pro
			370				375									380
15	Leu	Leu	Val	Pro	His	Glu	Asn	Val	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Tyr
	385					390					395					400
	His	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Ala	Asn	Val	Met	Lys	Leu	Gln
					405					410						415
	Arg	Asp	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Pro	Asp	Lys	Phe	Asp	Pro	Glu	Arg
				420						425						430
20	Phe	Phe	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Phe	Arg	Gly	Gln	His	Tyr	Glu	Phe	Ile
			435						440							445
	Pro	Phe	Gly	Ser	Gly	Arg	Arg	Ser	Cys	Pro	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Met
			450				455									460
25	Gln	Val	Glu	His	Leu	Thr	Ile	Ala	His	Leu	Ile	Gln	Gly	Phe	Asn	Tyr
	465					470						475				480
	Lys	Thr	Pro	Asn	Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Lys	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu
					485						490					495
	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	Asn	Pro	Ile	Glu	Val	Val	Ile	Thr	Pro	Arg	Leu
				500						505						510
30	Thr	Pro	Glu	Leu	Tyr											
				515												
	<210>	6														
35	<211>	517														
	<212>	PRT														
	<213>	Nicotiana tabacum														
	<220>															
40	<221>	Вариант														
	<222>	(1)...(517)														
	<223>	Вариант CYP82E10 G172R														
	<400>	6														
45	Met	Val	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Ile	Val	Gly	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	Leu
	1				5					10					15	
	Leu	Phe	Tyr	Phe	Ile	Arg	Thr	Lys	Lys	Ser	Gln	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro
				20						25						30

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
5 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
10 100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
15 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Arg Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
20 180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
25 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
30 260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
35 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
40 340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
45 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln

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

<210> 8
<211> 517
<212> PRT
5 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
10 <223> Вариант CYP82E10 A410T

<400> 8
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
15 Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
20 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
85 90 95
25 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
30 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
35 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
40 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
45 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
5 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
85 90 95
10 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
15 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
20 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
25 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
30 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
35 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
40 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
45 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln

405 410 415
His Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
5 435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
 450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
10 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
 500 505 510
Thr Pro Glu Leu Tyr
15 515

<210> 10
<211> 517
20 <212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
25 <222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E10 P419S

<400> 10
30 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
35 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
40 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
 115 120 125
45 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln

<210> 11
<211> 517
5 <212> PRT
<213> *Nicotiana tabacum*

<220>
<221> Вариант
10 <222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E10 G79S

<400> 11
15 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
20 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Ser Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
25 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
30 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
35 165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
40 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
45 245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270

Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285

Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300

5 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320

Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335

10 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350

Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365

Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380

15 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400

His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415

20 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430

Phe Phe Ala Ala Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445

Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Met
450 455 460

25 Gln Val Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480

Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495

30 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Ile Glu Val Val Ile Thr Pro Arg Leu
500 505 510

Thr Pro Glu Leu Tyr
515

35 <210> 12
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

40 <220>
<221> Вариант
<222> (1)... (517)
<223> Вариант CYP82E10 P107S

45 <400> 12
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15

Leu Phe Tyr Phe Ile Arg Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
5 Tyr Phe Asp Asp Asp Ser Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Ile Lys Asp Cys Phe
10 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Ser Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
15 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Cys
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Glu Ile Gln
145 150 155 160
20 Thr Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
25 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
30 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Lys Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
35 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
40 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
45 Leu Gln Thr Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr

Thr Pro Glu Leu Tyr
515

5 <210> 14
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

10 <400> 14
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30

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

25 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
30 145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

35 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
40 225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270

45 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg

290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
5 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
10 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
15 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445
20 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Arg Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
25 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515
30
<210> 15
<211> 517
<212> PRT
35 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
40 <223> Вариант CYP82E4 P38L

<400> 15
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
45 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Leu Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe

		35					40				45						
	His	Phe	Asn	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	
		50					55					60					
5	Asp	Leu	Ala	Asp	Lys	Tyr	Gly	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	Arg	Leu	Gly	Leu	
	65					70					75				80		
	Pro	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ala	Val	Lys	Asp	Cys	Phe	
					85					90				95			
	Ser	Thr	Asn	Asp	Ala	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Gly	
			100						105					110			
10	Asp	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Met	Leu	Phe	Leu	Ala	Asn	Tyr	Gly	
			115					120						125			
	Pro	Tyr	Trp	Arg	Lys	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ile	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	
	130						135						140				
15	Ala	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ala	Arg	Ile	Gln	
	145					150					155					160	
	Ala	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Tyr	Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr	
					165					170						175	
	Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Val	
				180						185					190		
20	Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Glu	Gln	
		195						200						205			
	Val	Glu	Arg	Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Met	Ile	Leu	Ser	Met	
	210						215						220				
25	Glu	Phe	Val	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Trp	Val	
	225					230					235					240	
	Asp	Phe	Gln	Gly	His	Val	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile	
					245						250				255		
	Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Trp	Leu	Glu	Glu	His	Ile	Asn	Lys	Arg	Glu	
				260						265					270		
30	Lys	Met	Glu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Asp	Val	
		275						280						285			
	Val	Leu	Ser	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Tyr	Leu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg	
	290						295						300				
35	Asp	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	
	305					310						315				320	
	Asp	Thr	Val	Ala	Leu	His	Ile	Asn	Trp	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	
					325					330					335		
	Asn	Gln	Lys	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Val	
				340						345					350		
40	Gly	Lys	Asp	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr	
		355						360					365				
	Leu	Gln	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Gly	Pro	
	370						375						380				
45	Leu	Leu	Val	Pro	His	Glu	Asn	Val	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Tyr	
	385					390					395					400	
	His	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Ala	Asn	Val	Met	Lys	Leu	Gln	
					405					410						415	

Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
 435 440 445
5 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
10 Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
 485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
 500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
 515
15

<210> 16
<211> 517
<212> PRT
20 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
25 <223> Вариант CYP82E4 D171N

<400> 16
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
 1 5 10 15
30 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
 20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
 35 40 45
35 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
 50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
 85 90 95
40 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
 100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
 115 120 125
45 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
 130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160

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

<210> 17
<211> 517
<212> PRT
5 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
10 <223> Вариант CYP82E4 E201K

<400> 17
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
15 Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
20 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
25 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125
30 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
35 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Lys Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
40 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
45 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val

Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160

Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

5 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

10 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220

Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240

Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255

15 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270

Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285

20 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320

Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335

25 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350

Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365

30 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380

Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400

His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415

35 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430

Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445

40 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Arg Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460

Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480

Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495

45 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510

Ala Pro Glu Leu Tyr

515

<210> 20
5 <211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>
10 <221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E4 T427I

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

260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
5 290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
10 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
15 370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
20 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Ile Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
25 450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
30 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515
35
<210> 21
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum
40
<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E4 V376M
45
<400> 21
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe

	1			5					10					15			
	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Trp	Thr	Lys	Lys	Ser	Gln	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	
				20					25					30			
5	Leu	Pro	Pro	Lys	Ile	Pro	Gly	Gly	Trp	Pro	Val	Ile	Gly	His	Leu	Phe	
			35					40					45				
	His	Phe	Asn	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	
		50					55					60					
	Asp	Leu	Ala	Asp	Lys	Tyr	Gly	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	Arg	Leu	Gly	Leu	
	65					70				75						80	
10	Pro	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ala	Val	Lys	Asp	Cys	Phe	
					85					90					95		
	Ser	Thr	Asn	Asp	Ala	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Gly	
				100					105					110			
	Asp	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Met	Leu	Phe	Leu	Ala	Asn	Tyr	Gly	
15			115					120					125				
	Pro	Tyr	Trp	Arg	Lys	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ile	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	
	130						135					140					
	Ala	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ala	Arg	Ile	Gln	
	145					150					155					160	
20	Ala	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Tyr	Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr	
					165					170					175		
	Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Val	
				180					185					190			
	Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Glu	Gln	
25			195					200					205				
	Val	Glu	Arg	Phe	Lys	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Met	Ile	Leu	Ser	Met	
	210						215					220					
	Glu	Phe	Val	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Trp	Val	
	225					230					235					240	
30	Asp	Phe	Gln	Gly	His	Val	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile	
					245					250					255		
	Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Trp	Leu	Glu	Glu	His	Ile	Asn	Lys	Arg	Glu	
				260					265					270			
	Lys	Met	Glu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Asp	Val	
35			275					280					285				
	Val	Leu	Ser	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Tyr	Leu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg	
	290						295						300				
	Asp	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	
	305					310					315					320	
40	Asp	Thr	Val	Ala	Leu	His	Ile	Asn	Trp	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	
					325						330				335		
	Asn	Gln	Lys	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Val	
				340						345				350			
	Gly	Lys	Asp	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr	
45			355					360					365				
	Leu	Gln	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Met	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Gly	Pro	
	370						375						380				

Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
5 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445
10 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
15 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510 515
Ala Pro Glu Leu Tyr
515
20
<210> 22
<211> 328
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum
25
<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(328)
<223> Вариант CYP82E4 W329Stop
30
<400> 22
Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
35 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
40 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
45 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125

Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140

Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160

5 Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

10 Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220

Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240

15 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255

Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270

20 Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285

Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320

25 Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn
325

<210> 23

30 <211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>

35 <221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E4 K364N

<400> 23

40 Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15

Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45

45 His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60

Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
5 Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125
10 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160
Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
15 Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
20 Val Glu Arg Phe Lys Lys Ala Phe Lys Asp Phe Met Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
25 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Ile Asn Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Glu Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
30 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Gly Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
35 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Asn Asp Leu Val Tyr
355 360 365
40 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
45 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile

435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
5 Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510
10 Ala Pro Glu Leu Tyr
515

<210> 24
15 <211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>
20 <221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E4 P382S

<400> 24
25 Met Leu Ser Pro Ile Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Phe Thr Phe
1 5 10 15
Leu Phe Phe Phe Leu Trp Thr Lys Lys Ser Gln Lys Pro Ser Lys Pro
20 25 30
30 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
His Phe Asn Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
35 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
40 Asp Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Met Leu Phe Leu Ala Asn Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Phe Lys His Val Arg Phe Ala Arg Ile Gln
145 150 155 160
45 Ala Ser Ile Lys Asn Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val

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

45

<210> 25
<211> 517

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

5 <221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E4 P458S

<400> 25

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

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Ile Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
5 Asn Gln Lys Ala Leu Thr Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Thr Lys Val
340 345 350
Gly Lys Asp Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
10 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
15 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asp Pro Asp Thr Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Ile Ala Thr Asp Ile Asp Phe Arg Gly Gln Tyr Tyr Lys Tyr Ile
435 440 445
20 Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Ser Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
Gln Val Glu His Leu Thr Met Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Arg Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Ile
485 490 495
25 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Leu Ile Ile Ala Pro Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515
30
<210> 26
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum
35
<400> 26
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
40 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
45 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe

				85					90					95					
	Ser	Thr	Asn	Asp	Ala	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Gly			
				100					105					110					
5	Glu	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ala	Met	Leu	Phe	Leu	Thr	Lys	Tyr	Gly			
			115					120					125						
	Pro	Tyr	Trp	Arg	Lys	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ile	Gln	Glu	Val	Leu	Ser			
			130					135				140							
	Ala	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys	His	Val	Arg	Phe	Gly	Lys	Ile	Gln			
	145					150					155					160			
10	Thr	Ser	Ile	Lys	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr			
				165						170					175				
	Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Trp	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Val			
				180						185				190					
15	Lys	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu	Ser	Gly	Lys	Gly	Asp	Glu	Gln			
			195					200					205						
	Val	Glu	Arg	Phe	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Phe	Ile	Ile	Leu	Ser	Met			
		210					215					220							
	Glu	Phe	Val	Leu	Trp	Asp	Ala	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Trp	Val			
	225					230					235				240				
20	Asp	Phe	Gln	Gly	His	Val	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile			
				245						250					255				
	Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Trp	Leu	Glu	Glu	His	Val	Lys	Lys	Arg	Glu			
			260							265					270				
25	Lys	Met	Glu	Val	Asn	Ala	Gln	Gly	Asn	Glu	Gln	Asp	Phe	Ile	Asp	Val			
			275					280					285						
	Val	Leu	Ser	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg			
		290					295					300							
	Asp	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala			
	305					310					315				320				
30	Asp	Thr	Val	Ala	Leu	His	Met	Asn	Trp	Gly	Met	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn			
				325						330					335				
	Asn	Gln	His	Ala	Leu	Lys	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Lys	Lys	Val			
			340						345					350					
35	Gly	Lys	Glu	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr			
			355					360						365					
	Leu	Gln	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Pro	Gly	Pro			
		370					375					380							
	Leu	Leu	Val	Pro	His	Glu	Asn	Val	Glu	Asp	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Tyr			
	385					390					395					400			
40	His	Ile	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Ala	Asn	Val	Met	Lys	Leu	Gln			
				405						410					415				
	Arg	Asp	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser	Asn	Pro	Asp	Lys	Phe	Asp	Pro	Glu	Arg			
				420						425					430				
45	Phe	Phe	Ala	Asp	Asp	Ile	Asp	Tyr	Arg	Gly	Gln	His	Tyr	Glu	Phe	Ile			
			435					440						445					
	Pro	Phe	Gly	Ser	Gly	Arg	Arg	Ser	Cys	Pro	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Leu			
			450				455							460					

Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495
5 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515

10

<210> 27
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

15

<220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E5 P72L

20

<400> 27
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15

25

Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45

30

Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Leu Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80

35

Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110

40

Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140

45

Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
 210 215 220

Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
 225 230 235 240

5 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
 245 250 255

Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
 260 265 270

10 Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
 275 280 285

Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
 290 295 300

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
 305 310 315 320

15 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
 325 330 335

Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
 340 345 350

20 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
 355 360 365

Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
 370 375 380

Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
 385 390 395 400

25 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
 405 410 415

Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
 420 425 430

30 Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
 435 440 445

Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
 450 455 460

Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
 465 470 475 480

35 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
 485 490 495

Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
 500 505 510

40 Ala Pro Glu Leu Tyr
 515

<210> 28

<211> 517

45 <212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

<222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E5 L143F

5

<400> 28

Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15

10

Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30

Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45

Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60

15

Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80

Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95

20

Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110

Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125

Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Phe Ser
130 135 140

25

Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160

Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

30

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205

Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220

35

Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240

Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255

40

Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
260 265 270

Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285

Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300

45

Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320

Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn

325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
5 Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
10 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
15 Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
20 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495
Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
500 505 510
25 Ala Pro Glu Leu Tyr
515

<210> 29
<211> 517
30 <212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
35 <222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E5 S174L

<400> 29
40 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
45 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu

Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460

Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480

5 Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495

Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
500 505 510

Ala Pro Glu Leu Tyr
10 515

<210> 30
<211> 517
15 <212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Вариант
20 <222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E5 M224I

<400> 30

25 Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45

30 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
35 85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125

40 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
45 165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190

Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Ile
210 215 220
5 Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
10 Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
15 Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
20 Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
25 Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
30 Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430
Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
35 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495
40 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515
45 <210> 31
<211> 517
<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> Вариант

5 <222> (1)...(517)

<223> Вариант CYP82E5 P235S

<400> 31

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

50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
5 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
10 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160
15 Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
20 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
25 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
30 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
35 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
40 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
45 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Val Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu Trp Ser Asn Pro Asp Lys Phe Asp Pro Glu Arg
420 425 430

Phe Phe Ala Asp Asp Ile Asp Tyr Arg Gly Gln His Tyr Glu Phe Ile
435 440 445
Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Met Thr Tyr Ala Leu
450 455 460
5 Gln Ala Glu His Leu Thr Ile Ala His Leu Ile Gln Gly Phe Asn Tyr
465 470 475 480
Lys Thr Pro Asn Asp Glu Pro Leu Asp Met Lys Glu Gly Ala Gly Leu
485 490 495
10 Thr Ile Arg Lys Val Asn Pro Val Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Leu
500 505 510
Ala Pro Glu Leu Tyr
515

15 <210> 33
<211> 421
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

20 <220>
<221> Вариант
<222> (1)...(421)
<223> Вариант CYP82E5 W422Stop

25 <400> 33
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15
Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
30 Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
35 Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
40 Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
45 Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160
Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175

Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
5 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
10 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
15 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
20 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
25 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr
385 390 395 400
30 His Ile Pro Lys Gly Thr Arg Leu Phe Ala Asn Val Met Lys Leu Gln
405 410 415
Arg Asp Pro Lys Leu
420

35 <210> 34
<211> 517
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

40 <220>
<221> Вариант
<222> (1)...(517)
<223> Вариант CYP82E5 P449L

45 <400> 34
Met Val Ser Pro Val Glu Ala Ile Val Gly Leu Val Thr Leu Thr Leu
1 5 10 15

Leu Phe Tyr Phe Leu Trp Pro Lys Lys Phe Gln Ile Pro Ser Lys Pro
20 25 30
Leu Pro Pro Lys Ile Pro Gly Gly Trp Pro Val Ile Gly His Leu Phe
35 40 45
5 Tyr Phe Asp Asp Asp Gly Asp Asp Arg Pro Leu Ala Arg Lys Leu Gly
50 55 60
Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Gly Pro Val Phe Thr Phe Arg Leu Gly Leu
65 70 75 80
10 Pro Leu Val Leu Val Val Ser Ser Tyr Glu Ala Val Lys Asp Cys Phe
85 90 95
Ser Thr Asn Asp Ala Ile Phe Ser Asn Arg Pro Ala Phe Leu Tyr Gly
100 105 110
Glu Tyr Leu Gly Tyr Ser Asn Ala Met Leu Phe Leu Thr Lys Tyr Gly
115 120 125
15 Pro Tyr Trp Arg Lys Asn Arg Lys Leu Val Ile Gln Glu Val Leu Ser
130 135 140
Ala Ser Arg Leu Glu Lys Leu Lys His Val Arg Phe Gly Lys Ile Gln
145 150 155 160
20 Thr Ser Ile Lys Ser Leu Tyr Thr Arg Ile Asp Gly Asn Ser Ser Thr
165 170 175
Ile Asn Leu Thr Asp Trp Leu Glu Glu Leu Asn Phe Gly Leu Ile Val
180 185 190
Lys Met Ile Ala Gly Lys Asn Tyr Glu Ser Gly Lys Gly Asp Glu Gln
195 200 205
25 Val Glu Arg Phe Arg Lys Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ile Leu Ser Met
210 215 220
Glu Phe Val Leu Trp Asp Ala Phe Pro Ile Pro Leu Phe Lys Trp Val
225 230 235 240
30 Asp Phe Gln Gly His Val Lys Ala Met Lys Arg Thr Phe Lys Asp Ile
245 250 255
Asp Ser Val Phe Gln Asn Trp Leu Glu Glu His Val Lys Lys Arg Glu
260 265 270
Lys Met Glu Val Asn Ala Gln Gly Asn Glu Gln Asp Phe Ile Asp Val
275 280 285
35 Val Leu Ser Lys Met Ser Asn Glu Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Ser Arg
290 295 300
Asp Thr Val Ile Lys Ala Thr Val Phe Ser Leu Val Leu Asp Ala Ala
305 310 315 320
40 Asp Thr Val Ala Leu His Met Asn Trp Gly Met Ala Leu Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Gln His Ala Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Asp Lys Lys Val
340 345 350
Gly Lys Glu Arg Trp Val Glu Glu Ser Asp Ile Lys Asp Leu Val Tyr
355 360 365
45 Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Gly Pro
370 375 380
Leu Leu Val Pro His Glu Asn Val Glu Asp Cys Val Val Ser Gly Tyr

<223> «Прямой» праймер для экзона 2 гена CYP82E10

<400> 37

aggtcgcgct gattcttg

18

5

<210> 38

<211> 26

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> «Обратный» праймер для экзона 2 гена CYP82E10

<400> 38

agatgaatac ccatctatct aggagt

26

15

<210> 39

<211> 2752

<212> ДНК

<213> *Nicotiana tabacum*

20

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)...(50)

<223> 5' UTR CYP82E4v2

25

<220>

<221> экзон

<222> (51)...(989)

<223> Последовательность экзона 1 CYP82E4v2

30

<220>

<221> интрон

<222> (990)...(1990)

<223> Последовательность интрона CYP82E4v2

35

<220>

<221> экзон

<222> (1991)...(2602)

<223> Последовательность экзона 2 CYP82E4v2

40

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2603)...(2685)

<223> 3' UTR CYP82E4v2

<400> 39

aaggaagttg cccgatagtta tattctcaac ttcttatcta aaaatccata atgctttctc 60
ccatagaagc cattgtagga ctagtaacct tcacatttct cttcttcttc ctatggacaa 120
aaaaatctca aaaaccttca aaacccttac caccgaaaat ccccggagga tggccggtaa 180

45

tcggccatct tttccacttc aatgacgacg gcgacgaccg tccattagct cgaaaactcg 240
gagacttagc tgacaaatac ggccccgttt tcaacttttcg gctaggcctt ccccttgtct 300
tagttgtaag cagttacgaa gctgtaaaaag actgtttctc tacaaatgac gccatttttt 360
ccaatcgtcc agctttttctt tacggcgatt accttggtca caataatgcc atgctatttt 420
5 tggccaatta cggacottac tggcgaaaaa atcgaaaatt agttattcag gaagttctct 480
ccgctagtcg tctcgaaaaa ttcaaacacg tgagatttgc aagaattcaa gcgagcatta 540
agaatttata tactcgaatt gatggaaatt cgagtacgat aaatttaact gattggttag 600
aagaattgaa ttttgggtctg atcgtgaaga tgatcgctgg aaaaaattat gaatccggta 660
aaggagatga acaagtggag agatttaaga aagcgtttaa ggattttatg attttatcaa 720
10 tggagtttgt gttatgggat gcatttccaa ttccattatt taaatgggtg gattttcaag 780
ggcatgttaa ggctatgaaa aggactttta aagatataga ttctgttttt cagaattggt 840
tagaggaaca tattaataaa agagaaaaaa tggaggtaa tgcagaaggg aatgaacaag 900
atttcattga tgtgggtgctt tcaaaaatga gtaatgaata tcttggtgaa ggttactctc 960
gtgatactgt cattaagca acggtgtttg taagtctatc tgtcattttt catttattca 1020
15 cttttatttt gaggagcaga catgttaata ataatttggg gcaactgtaa agttatctat 1080
gtgtacaggt tcgagcctca ggtgcaacca ctaatgcttg tattagatta tgttgtctgc 1140
atcatacccc taattggagt gtggctcttc ccgaaccctg caatgctgga tgctggatgc 1200
tttatgtatc agactgacct ttttgttaaa ctatctaaat actaaggatg atgatttaat 1260
aaaaatatag aatggtaaac agaaaaagat gagattattt ttggggctat atggattcgc 1320
20 ccgggctttg ggaggtaaaa cggtatctac cagttgagac ttactccag aactttatct 1380
cgagagctct gaataaaaaat gaaatagtat ttaccactcc aaaatctttg atggtaaaaa 1440
gatgagatat aacctcttat aattgattga accacgttga tagaataaaa cttctttact 1500
cccattcagc ataagaaaaa tgaaaccaa cggaaattctt ctctttttta gggggaaatt 1560
ccttaattgc ttgttgaata tagattcatg tcgttattct atttttaata atgatgaaaa 1620
25 tcaatatagt caaagttaat acttatgtca tttggtttgc ggacaagtta tattggaact 1680
atataatacg tctattatag aatagtgatt atttagagga tatacatttt ttttggataa 1740
atatttgatt tattggatta aaaatagaat atacaggtaa ggtctaaaac gtgtgtttgc 1800
ttttacacta aataaacttg acctcgtaca attctaagaa aatatttgaa ataaatgaat 1860
tattttattg ttaatcaatt aaaaaaatca tagtatagat gagatgtgtg catacttgac 1920
30 aataactata ctaactaaaa caaggatgt gaataattga tattcctttt ttaattattc 1980
ttttttccag agtttggctt tggatgcagc agacacagtt gctcttcaca taaattgggg 2040
aatggcatta ttgataaaca atcaaaaggc cttgacgaaa gcacaagaag agatagacac 2100
aaaagttggg aaggacagat gggtagaaga gagtgatatt aaggatttgg tatacctcca 2160
agctattggt aaagaagtgt tacgattata tccaccagga cctttggttag taccacacga 2220
35 aaatgtagaa gattgtgttg ttagtgata tcacattcct aaagggacaa gattattcgc 2280
aaacgtcatg aaactgcaac gtgatcctaa actctggtct gatcctgata ctttcgatcc 2340
agagagattc attgctactg atattgactt tcgtggtcag tactataagt atatccggtt 2400
tggttctgga agacgatctt gtccagggat gacttatgca ttgcaagtgg aacacttaac 2460
aatggcacat ttgatccaag gtttcaatta cagaactcca aatgacgagc cettggatat 2520
40 gaaggaaggg gcaggcataa ctatacgtaa ggtaaatcct gtggaactga taatagcgcc 2580
tcgcctggca cctgagcttt attaaaacct aagatctttc atcttgggtg atcattgtat 2640
aatactccta aatggatatt catttacctt ttatcaatta attgtcagta cgagtttttc 2700
taatttggta catttgtaat aataagtaaa gaataattgt gctaataat aa 2752

45 <210> 40
<211> 2685
<212> ДНК

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> 5'UTR

5 <222> (1)...(30)

<223> 5'UTR CYP82E5v2

<220>

<221> экзон

10 <222> (31)...(969)

<223> Последовательность экзона 1 CYP82E5v2

<220>

<221> интрон

15 <222> (970)...(2023)

<223> Последовательность интрона CYP82E5v2

<220>

<221> экзон

20 <222> (2024)...(2635)

<223> Последовательность экзона 2 CYP82E5v2

<220>

<221> 3'UTR

25 <222> (2636)...(2685)

<223> 3'UTR CYP82E5v2

<400> 40

30 gattcccaag ttcttttcta aaactccata atggtttctc ccgtagaagc cattgtagga 60
ctagtaacc ttacacttct cttctacttc ctatggccca aaaaatttca aataccttca 120
aaaccattac caccgaaaat tcccggaggg tggccggtaa tcggccatct tttctacttc 180
gatgatgacg gcgacgaccg tccattagct cgaaaactcg gagacttagc tgacaaatac 240
ggcccggttt tcactttccg gctaggcctt ccgcttgtgt tagttgtaag cagttacgaa 300
gctgtaaaaag actgcttctc taaaaatgac gccattttct ccaatcgtcc agcttttctt 360
35 tacggtgaat accttggtta cagtaatgcc atgctatfff tgacaaaata cggaccttat 420
tggcgaaaaa atagaaaatt agtcattcag gaagttctct ctgctagtcg tctcgaaaaa 480
ttgaagcacg tgagatttgg taaaattcaa acgagcatta agagtttata cactcgaatt 540
gatggaaatt cgagtacgat aaatctaact gattggttag aagaattgaa ttttgggtctg 600
atcgtgaaaa tgatcgctgg gaaaaattat gaatccggta aaggagatga acaagtggag 660
40 agatttagga aagcgtttta ggattttata attttatcaa tggagtttgt gttatgggat 720
gcttttccaa ttccattggt caaatgggtg gattttcaag gccatgttaa ggccatgaaa 780
aggacattta aggatataga ttctgttttt cagaattggt tagaggaaca tgtcaagaaa 840
agagaaaaaa tggagggttaa tgcacaaggg aatgaacaag atttcattga tgtgggtgctt 900
tcaaaaatga gtaatgaata tcttgatgaa ggttactctc gtgatactgt cataaaagca 960
45 acagtgtttg taagttcatt ttcatttttc attattcagt ctgattttga ggaatagaca 1020
ggttaataat aatttaagta attagattat ctaaatacta aggatgatta tatatagtaa 1080
aatgtagaaa tgataaatgg aaaaaagatg agaatttttt gtgcctcgac taatctatat 1140

atctttggga gttaaaagtg cttcaccaaa ggggactttt cctcatagct caagttagaa 1200
gtttgattat agatgaaaga gtatttatca cttcacgaac tctgatgata aaagtaaagt 1260
agatataacc agttataatt gatagaataa aacttcatta ctcccattga gcataaaaaa 1320
5 aaaagtaaaa gggacttctt ctcttttttt tagggagaaa ttctttaatt gtttgtaaa 1380
tatagattca tgtttttttt ttcttctatt tctaataata atggttcttg aatcaggtcg 1440
ttgactttgt agcagcaata tagtcaaagc taatatccat gttatttggg tttcgaacaa 1500
gttatactga aattatatat acgggtatta aataataaca ttattattta taggatatac 1560
tttttttatt gggtaaatat tacaacaaca acaactgact cagtaaaatt ttactagtgg 1620
10 ggtatgggga gggtagtggt tatgcagacc ttaccctac cccgaaggag tagagggatt 1680
gtttccgaaa gaccctcggc tcaagaaaac aaaaagagac aatatcagta ccaccacaga 1740
tcatattatt aggtaaagtgt tattttattg aattaaagat gaaatataca ggtaaggat 1800
aaaacgtgta tttgatttta cactagataa atttgacctc gtacatctct aagagaaagc 1860
tgaataaat gaattttaa tttaaaaaaa aaattcatta gtataatgag atgtgcatac 1920
ttgacaatta ctatactaaa tagaacaagg ttcggcagat agtgacacta acctactttt 1980
15 gtattgaatt atccttttta attttattct aatttgtcta cagagtttgg tcttgatgc 2040
tgcggacaca gttgctcttc acatgaattg gggaatggca ttactgataa acaatcaaca 2100
tgccttgaag aaagcacaag aagagatcga taaaaagtt ggtaaggaaa gatgggtaga 2160
agagagtgat attaaggatt tgggtctacct ccaagctatt gttaaagaag tgttacgatt 2220
20 atatccacca ggaccttat tagtacctca tgaaaatgta gaggattgtg ttgttagtgg 2280
atatcacatt ctaaaggga ctagactatt cgcgaacgtt atgaaattgc agcgcgatcc 2340
taaactctgg tcaaatcctg ataagtttga tccagagaga ttcttcgctg atgatattga 2400
ctaccgtggg cagcactatg agtttatccc atttggttct ggaagacgat cttgtccggg 2460
gatgacttat gcattacaag tggaacacct aacaatagca catttgatcc agggtttcaa 2520
ttacaaaact ccaaatgacg agcccttggg tatgaaggaa ggtgcaggat taactatacg 2580
25 taaagtaaat cctgtagaag tgacaattac ggctcgctg gcacctgagc tttattaaaa 2640
ccttagatgt tttatcttga ttgtactaat atatatagca gaaaa 2685

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение или часть растения табака, содержащее/содержащая мутацию в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10.

2. Растение или часть растения табака по п. 1, где никотиндеметилаза CYP82E10 имеет последовательность, выбранную из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8 и 9.

3. Растение или часть растения табака по п. 1 или п. 2, где мутация приводит к модификации никотиндеметилазы CYP82E10 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 79, 107, 382, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

4. Растение или часть растения табака по п. 3, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену остатком серина остатка глицина в положении 79;
- б) замену остатком серина остатка пролина в положении 107;
- в) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 419; и
- д) любую их комбинацию.

5. Растение или часть растения табака по одному из п.п. 1-4, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E4, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E4.

6. Растение или часть растения табака по п. 5, где последовательность никотиндеметилазы CYP82E4 выбрана из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

7. Растение или часть растения табака по п. 5 или п. 6, где мутация приводит к модификации никотиндеметиلاзы CYP82E4 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 329, 364, 376, 382 и 458, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

5

8. Растение или часть растения табака по п. 7, где мутация выбрана из группы, включающей:

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;
- б) замену остатком аспарагина остатка лизина в положении 364;
- в) замену остатком метионина остатка валина в положении 376;
- г) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;
- д) замену остатком серина остатка пролина в положении 458; и
- е) любую их комбинацию.

10

9. Растение или часть растения табака по одному из п.п. 1-8, которое/которая дополнительно содержит мутацию в гене, кодирующем никотиндеметилазу CYP82E5, где указанная мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E5.

15

10. Растение или часть растения табака по п. 9, где последовательность никотиндеметилазы CYP82E5 выбрана из группы, которая включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32.

20

11. Растение или часть растения табака по п. 9 или п. 10, где мутация приводит к модификации никотиндеметилазы CYP82E5 в положении, выбранном из группы, включающей аминокислотные остатки 422 и 449, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

25

12. Растение или часть растения табака по п. 11, где мутация выбрана из группы, включающей:

30

- а) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422;
- б) замену остатком лейцина остатка пролина в положении 449; и
- в) любую их комбинацию.

13. Растение или часть растения табака по одному из п.п. 9-12, которое/которая содержит мутацию в гене никотиндеметилазы CYP82E10 и гене никотиндеметилазы CYP82E4.

5

14. Растение или часть растения табака по одному из п.п. 1-13, где растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

10

15. Растение или часть растения табака по п. 14, где никотиндеметилаза CYP82E10 содержит мутацию в положении 382, никотиндеметилаза CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и никотиндеметилаза CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

15

16. Растение или часть растения табака по п. 15, где мутация выбрана из группы, включающей:

а) замену остатком серина остатка пролина в положении 382;

б) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 329;

20 в) замену стоп-кодоном остатка триптофана в положении 422; и

г) любую их комбинацию.

17. Растение или часть растения табака по одному из п.п. 13-16, где в растении или его части меньше 1,5% никотина превращается в норникотин.

25

18. Растение или часть растения табака по п. 17, где в растении или его части не более 0,5% никотина превращается в норникотин.

19. Семя растения табака по одному из п.п. 1-18 или его потомство.

30

20. Табачное изделие, изготовленное из растения или части растения табака или его потомства по одному из п.п. 1-19.

21. Способ снижения онкогенного потенциала табачного изделия, заключающийся в том, что приготавливают табачное изделие из растения или части растения табака или его потомства по одному из п.п. 1-18.

5 22. Способ снижения уровня норникотина или снижения уровня превращения никотина в норникотин в растении или части растения табака, заключающийся в том, что интродуцируют в геном растения мутацию по меньшей мере в один аллель каждого из по меньшей мере трех генов никотиндеметилазы, где мутация снижает экспрессию указанного гена
10 никотиндеметилазы и где первый из указанных генов никотиндеметилазы кодирует специфическую для корня никотиндеметилазу, которая участвует в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении или части растения табака.

15 23. Способ по п. 22, в котором специфическая для корня никотиндеметилаза представляет собой никотиндеметилазу CYP82E10, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2,
20 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

25 24. Способ по п. 23, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E10 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 79, 107, 382, 419 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2.

30 25. Способ по п. 24, в котором замена в положении 79, 107, 382 или 419 представляет собой замену на остаток серина.

26. Способ по одному из п.п. 22-25, в котором второй из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E4.

5 27. Способ по п. 26, в котором никотиндеметилаза CYP82E4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21; и

10 б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21.

15 28. Способ по п. 27, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E4 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 329, 364, 382, 458 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 14.

20 29. Способ по п. 28, в котором замена представляет собой замену в положении 329 на стоп-кодон, замену в положении 364 на остаток аспарагина, замену в положении 382 на остаток серина, замену в положении 458 на остаток серина или любую их комбинацию.

30. Способ по одному из п.п. 22-29, в котором третий из указанных генов никотиндеметилазы кодирует никотиндеметилазу CYP82E5.

25 31. Способ по п. 30, в котором никотиндеметилаза CYP82E5 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32; и

30 б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32.

32. Способ по п. 31, в котором аминокислотная последовательность никотиндеметилазы CYP82E5 имеет замену аминокислотного остатка в положении, выбранном из группы, включающей остатки 422 и 449 и любую их комбинацию, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 26.

5

33. Способ по п. 32, в котором замена в положении 422 представляет собой замену на стоп-кодон, замена в положении 449 представляет собой замену на остаток лейцина или любую их комбинацию.

10

34. Способ по одному из п.п. 22-33, в котором растение или часть растения табака является гомозиготным/гомозиготной по указанной мутации.

35. Способ по одному из п.п. 22-34, в котором интродукция предусматривает применение протокола селекции.

15

36. Способ по одному из п.п. 22-35, в котором растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

20

37. Растение или часть растения табака по п.п. 1-19, где растение представляет собой растение табака сорта Бёрли, Вирджиния, растение табака, предназначенное для сушки на пару, воздушной сушки, огневой сушки, растение сорта Ориентальный (восточный) или растение, из которого получают темный сорт табака.

25

38. Способ идентификации растения табака с низкими уровнями норникотина, заключающийся в том, что подвергают скринингу образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 1 или 3.

30

39. Способ по п. 38, в котором растение табака не является конвертером.

40. Способ по п. 38 или п. 39, в котором скрининг осуществляют с использованием последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 1, 3, 35, 36, 37 и 38.

5 41. Способ по одному из п.п. 38-40, заключающийся дополнительно в том, что подвергают скринингу указанный образец ДНК или другой образец ДНК из представляющего интерес растения табака в отношении присутствия мутации в SEQ ID NO: 14, присутствия мутации в SEQ ID NO: 26 или присутствия мутации в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 26.

10

42. Выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, которая содержит SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

15 б) нуклеотидную последовательность, которая содержит фрагмент, состоящий по меньшей мере из 20 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 1, 3 или 4;

в) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 97% идентична полной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где полинуклеотид кодирует полипептид, который принимает участие в метаболическом превращении никотина в норникотин в растении;

20 г) нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 5-13, или его фрагмент, содержащий по меньшей мере 115 смежных остатков;

д) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, последовательность которого идентична по меньшей мере на 98% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13; и

25 е) нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности по одному из предыдущих подпунктов (а)-(д).

30

43. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13;

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13; и

в) аминокислотную последовательность, которая представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, где фрагмент содержит по меньшей мере 115 смежных остатков аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13.

44. Растение или часть растения табака, гомозиготное/гомозиготная по мутации в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E4 и гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E5, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10, CYP82E4 и CYP82E5, где никотиндеметилаза CYP82E10 содержит мутацию в положении 382, никотиндеметилаза CYP82E4 содержит мутацию в положении 329 и никотиндеметилаза CYP82E5 содержит мутацию в положении 422, где нумерация соответствует SEQ ID NO: 2, 14 и 26 соответственно.

45. Мутация в гене, который кодирует никотиндеметилазу CYP82E10, где мутация приводит к пониженной экспрессии или функции никотиндеметилазы CYP82E10.

46. Растение, имеющее мутацию в гене *CYP82E10*, которая ингибирует активность никотиндеметилазы в корнях, мутацию в гене *CYP82E4v2*, которая ингибирует активность никотиндеметилазы в стареющих листьях, и мутацию в гене *CYP83E5*, которая ингибирует активность никотиндеметилазы в зеленых листьях.

Фиг. 1А

1 ttttcaatttttgttactttttgtatttatcatattattatgcatagccctaaattatcta
61 taaaagggagttggtgatagtttgattcccaagtgccttttctaaaaatccataATGGTT
M V 2
121 TCTCCCGTAGAAGCCATCGTAGGACTAGTAACTCTTACACTTCTCTTCTACTTCATACGG
S P V E A I V G L V T L T L L F Y F I R 22
181 ACCAAAAATCTCAAAAACCTTCAAAACCATACCACCGAAAATCCCCGGAGGGTGGCCG
T K K S Q K P S K P L P P K I P G G W P 42
241 GTAATCGGCCATCTTTTCTATTTTCGATGACGACAGCGACCGTCCATTAGCACGAAAA
V I G H L F Y F D D D S D D R P L A R K 62
301 CTCGGAGACTTAGCTGACAAATACGGCCCGTTTTCACTTTTCGGCTAGGCCTTCCGCTT
L G D L A D K Y G P V F T F R L G L P L 82
361 GTGTTAGTTGTAAGCAGTTACGAAGCTATAAAAGACTGCTTCTCTACAAATGATGCCATT
V L V V S S Y E A I K D C F S T N D A I 102
421 TTCTCCAATCGTCCAGCTTTTCTTTATGGCGAATACCTTGGCTACAATAATGCCATGCTA
F S N R P A F L Y G E Y L G Y N N A M L 122
481 TTTTGGACAAAATACGGACCTTACTGGCGAAAAATAGAAAATTAGTCATTCCAGGAAGTT
F L T K Y G P Y W R K N R K L V I Q E V 142
541 CTCTGTGCTAGTCGTCTCGAAAAATTGAAGCACGTGAGATTTGGTGAAAATTCAGACGAGC
L C A S R L E K L K H V R F G E I Q T S 162
601 ATTAAGAATTTATACACTCGAATTGATGGAAAATTCGAGTACGATAAATCTAACCGATTGG
I K N L Y T R I D G N S S T I N L T D W 182
661 TTAGAAGAATTGAATTTTGGTCTGATCGTGAAAATGATCGCTGGGAAAAATTATGAATCC
L E E L N F G L I V K M I A G K N Y E S 202
721 GGTAAGGAGATGAACAAGTGGAGAGATTTAGGAAAGCGTTTAAGGATTTTATAATTTTA
G K G D E Q V E R F R K A F K D F I I L 222
781 TCAATGGAGTTTGTGTTATGGGATGCTTTTCCAATCCATTGTTCAAATGGGTGGATTTT
S M E F V L W D A F P I P L F K W V D F 242
841 CAAGGCCATGTTAAGGCCATGAAAAGGACATTTAAGGATATAGATTCTGTTTTTCAGAA
Q G H V K A M K R T F K D I D S V F Q N 262
901 TGGTTAGAGGAACATGTCAAGAAAAAAGAAAAATGGAGGTTAATGCAGAAGGAAATGAA
W L E E H V K K K E K M E V N A E G N E 282
961 CAAGATTTCAATGATGTGGTGCTTTCAAAAATGAGTAATGAATATCTTGATGAAGGCTAC
Q D F I D V V L S K M S N E Y L D E G Y 302

Фиг. 1Б

1021 TCTCGTGA^TACTGTCATAAAAGCAACAGTGT^TTgtaagttcatctcatttttcatttatt
S R D T V I K A T V F 313

1081 ctttgaggaatagacagg^tttaatagtaatttaagtaattagattatctaataactaagga

1141 tgagtaaatatggcaaaaatatagaatgataaatggaaaaggatgataat^tttttatgcc

1201 cggactaact^tttgggag^tttaaagcacttcc^ttaccaatagggacttttcttcaagc

1261 t^cgatcttgatgaaactctgtggttaaaaaaatgagatatanccaattataattgataga

1321 ataaaactttattactcccattgagcataacaaaacaaaaaaag^taaagggacttcttc

1381 tcttttttagggagaaattcttttgattg^tttgttaatatagattcatgttttttttatt

1441 tctaataataattgtgcttgaatcggtcgcgctgattcttggcttttttagcagcaatag

1501 agtcaaagctaataacatattat^tttgg^tttt^tcgaataagttatactgaaattatataat

1561 acgggtattaaataataacatgattat^tataggatagct^tttttttattgggtaaatat

1621 attttttttaattaaaaatgaaatatacaagtaagg^tataaaacactat^ttgattttaca

1681 ctagataaa^tttgcccctg^tacatctc^ttaagagaagagctgaaataaatgaattt^taaat

1741 ttcagaaaaaaataaattcattag^tataatgagatgtc^tgatacttgacaattactatact

1801 aactagaacaagg^ttcagcagatag^tgacgctaac^ttat^tttt^tgtattgaattat^tctaa

1861 tttgtccacagAGTTTAGTCTTGGATGCTGCGGACACAGTTGCTCTTCACATGAATTGGG
S L V L D A A D T V A L H M N W 329

1921 GAATGGCATTATTGATAAACAATCAACATGCCTTGAAGAAAGCGCAAGAAGAGATAGATA
G M A L L I N N Q H A L K K A Q E E I D 349

1981 AAAAAGTTGGTAAGGATAGATGGGTAGAAGAGAGTGATATTAAGGATTGGTATACCTCC
K K V G K D R W V E E S D I K D L V Y L 369

2041 AA^ACTATTGTTAAAGAAGTGTACGATTATATCCACCGGGACCTTTATTAGTACCCCATG
Q T I V K E V L R L Y P P G P L L V P H 389

2101 AAAATGTAGAGGATTGTGTTGTTAGTGGATATCACATTCCTAAAGGGACTAGACTATTCG
E N V E D C V V S G Y H I P K G T R L F 409

2161 CGAACGTTATGAAATTACAGCGGATCCTAAACTCTGGTCAAATCCTGATAAGTTCGATC
A N V M K L Q R D P K L W S N P D K F D 429

Фиг. 1В

2221 CAGAGAGATTTTCGCTGCTGATATTGACTTTCGTGGTCAACACTATGAGTTTATCCCAT
P E R F F A A D I D F R G Q H Y E F I P 449

2281 TTGGTTCTGGAAGACGATCTTGTCCGGGGATGACTTATGCAATGCAAGTGGAACACCTAA
F G S G R R S C P G M T Y A M Q V E H L 469

2341 CAATCGCACACTTGATCCAGGGTTTCAATTACAAAACCTCAAATGACGAGCCCTTGGATA
T I A H L I Q G F N Y K T P N D E P L D 489

2401 TGAAGGAAGGTGCAGGATTAACATACGTAAGGTAATCCTATAGAAGTGGAATTACGC
M K E G A G L T I R K V N P I E V V I T 509

2461 CTCGCCCTGACACCTGAGCTTTATtaaaatctaagatgttttatcttggttgatcattggt
P R L T P E L Y 517

2521 taatactctagatagatgggtattcatctatctttttaaattaattgtcagtagagt

2581 gtttctaatttggttaagtttgtaacaacaagtaagaaggattgtgctagtagta

4/8

CYP82E10 aaattatcta taaaagggaa gttggtgata gtttgattcc caagtgcctt tctaaaaatc cataATGCCT TCTCCCGTAG AAGCCATCGT AGGACTAGTA 100
CYP82E5v2 gattccc caagtgcctt tctaaaaatc cataATGCCT TCTCCCGTAG AAGCCATCGT AGGACTAGTA
CYP82E4v2 aaggaa gttgcccata gttatatctt caacttccta tctaaaaatc cataATGCCT TCTCCCAIAG AAGCCATIGT AGGACTAGTA

CYP82E10 ACTCTTACAC TTCTCTTCTA CTTCATACGG ACCAAAAAAT CTCAAAAACC TTCAAAACCA TTACCAGCGA AAATCCCGGG AGGGTGGCCG GTAATCGGCC 200
CYP82E5v2 ACCCTTACAC TTCTCTTCTA CTTCCTATGG CCCAAAAAAT TTCAAATACG TTCAAAACCA TTACCAGCGA AAATCCCGGG AGGGTGGCCG GTAATCGGCC
CYP82E4v2 ACCTTCACAT TTCTCTTCTT CTTCCTATGG ACCAAAAAAT CTCAAAAACC TTCAAAACCC TTACCAGCGA AAATCCCGGG AGGATGGCCG GTAATCGGCC

CYP82E10 ATCTTTTCTA TTTCGATGAC GACAGCGAGC ACCGCCATT AGCACGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACTT TTCCGGCTAGG 300
CYP82E5v2 AFTCTTTCTA CTTCGATGAT GACGGCGAGC ACCGCCATT AGCTCGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACTT TTCCGGCTAGG
CYP82E4v2 ATCTTTTCCA CTTCATGAC GACGGCGAGC ACCGCCATT AGCTCGAAAA CTCGGAGACT TAGCTGACAA ATACGGCCCG GTTTTCACTT TTCCGGCTAGG

CYP82E10 CCTTCCGCTT GCTTACTTG TAAGCAGTTA CGAACCTATA AAGACTGCT TCTCTACAAA TGATGCCATT TTCTCGAATC GTCCAGCTTT TCTTTATGGC 400
CYP82E5v2 CCTTCCGCTT GCTTACTTG TAAGCAGTTA CGAACCTATA AAGACTGCT TCTCTAGAAA TGACGGCATT TTCTCCAATC GTCCAGCTTT TCTTTATGGC
CYP82E4v2 CCTTCCGCTT GCTTACTTG TAAGCAGTTA CGAACCTATA AAGACTGCT TCTCTAGAAA TGACGGCATT TTCTCCAATC GTCCAGCTTT TCTTTATGGC

CYP82E10 GAATACCTTG GCTACANTAA TGCCAGCTTA TTTTTCGCAA AATACGGACC TTACTGCGCA AAAAAAGAA AATTAGTCAT TCAGGAGTTT GCTCTGCTTA 500
CYP82E5v2 GAATACCTTG GCTACAGTAA TGCCAGCTTA TTTTTCGCAA AATACGGACC TTACTGCGCA AAAAAAGAA AATTAGTCAT TCAGGAGTTT GCTCTGCTTA
CYP82E4v2 GATTACCTTG GCTACANTAA TGCCAGCTTA TTTTTCGCAA AATACGGACC TTACTGCGCA AAAAAAGAA AATTAGTTAT TCAGGAGTTT GCTCTGCTTA

CYP82E10 GTCGTCTCGA AAAATTCGAG CACGTGAGAT TTGCTGAAAT TCACACGAGC AATTAAGAAAT TATAGACTCG AAITGATGGA AATTCGAGTA CGATAAATCT 600
CYP82E5v2 GTCGTCTCGA AAAATTCGAG CACGTGAGAT TTGCTGAAAT TCACACGAGC AATTAAGAAAT TATAGACTCG AAITGATGGA AATTCGAGTA CGATAAATCT
CYP82E4v2 GTCGTCTCGA AAAATTCGAG CACGTGAGAT TTGCTGAAAT TCACACGAGC AATTAAGAAAT TATAGACTCG AAITGATGGA AATTCGAGTA CGATAAATCT

CYP82E10 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTGG TCTGATCGTG AATATGATCG CTGGGAAAAA TTATGAAATC GGTAAACGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTT 700
CYP82E5v2 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTGG TCTGATCGTG AATATGATCG CTGGGAAAAA TTATGAAATC GGTAAACGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTT
CYP82E4v2 AACCGATTGG TTAGAAGAAT TGAATTTGG TCTGATCGTG AATATGATCG CTGGGAAAAA TTATGAAATC GGTAAACGAG ATGAAACAAGT GGAGAGATTT

CYP82E10 AGGAAAGCGT TTAAGGATTT TATAATTTTA TCAATCGAGT TTGTTTATG GGAATGTTT CCAATTCAT TGTTCAAATG GGTGGATTTT CAAGGCCATG 800
CYP82E5v2 AGGAAAGCGT TTAAGGATTT TATAATTTTA TCAATCGAGT TTGTTTATG GGAATGTTT CCAATTCAT TGTTCAAATG GGTGGATTTT CAAGGCCATG
CYP82E4v2 AAGAAAGCGT TTAAGGATTT TATAATTTTA TCAATCGAGT TTGTTTATG GGAATGTTT CCAATTCAT TATTAAATG GGTGGATTTT CAAGGCCATG

CYP82E10 TTAAGGCCAT GAAAAGGACA TTTAAGGATA TAGATTCTGT TTTTCAGAAT TGGTTAGAGG AACATGTCTA GAAAAAGAA AAAATGGAGG TTAATGCAGA 900
CYP82E5v2 TTAAGGCCAT GAAAAGGACA TTTAAGGATA TAGATTCTGT TTTTCAGAAT TGGTTAGAGG AACATGTCTA GAAAAGGAA AAAATGGAGG TTAATGCAGA
CYP82E4v2 TTAAGGCTAT GAAAAGGACT TTTAAGGATA TAGATTCTGT TTTTCAGAAT TGGTTAGAGG AACATATTAA TAAAGAGAA AAAATGGAGG TTAATGCAGA

CYP82E10 AGGAAATGAA CAAGATTTCG TTGATGTGGT GCTTTCAAAA ATGAGTAATG AATATCTTGA TGAAGGCTAC TCTCGTGATA CTGTCAATAA AGCAACAGTG 1000
CYP82E5v2 AGGAAATGAA CAAGATTTCG TTGATGTGGT GCTTTCAAAA ATGAGTAATG AATATCTTGA TGAAGGCTAC TCTCGTGATA CTGTCAATAA AGCAACAGTG
CYP82E4v2 AGGAAATGAA CAAGATTTCG TTGATGTGGT GCTTTCAAAA ATGAGTAATG AATATCTTGA TGAAGGCTAC TCTCGTGATA CTGTCAATAA AGCAACAGTG

Фиг. 2А

CYP82E10 TTTgtaagtt catct..cat ttttcattf. af...tct.. .ttgaggaa tagacaggtt aatagtaatt ta.agtaa.. .ttagattat ctaaatacta 1100
CYP82E5V2 TTTgtaagtt caatt..coat ttttcatta. ttcagbtetga ttttgaggaa tagacaggtt aatagtaatt ta.agtaa.. .ttagattat ctaaatacta
CYP82E4V2 TTTgtaagtt cacotgtcat ttttcattfa ttcacttita ttttgaggag cagacatgct aatagtaatt tggagcaact gtaaagtta cttatgtgtac

CYP82E10 aggatgagta aatatggcaa aaatatagaa tgataaatgg aaaag.gatg ataatttttt atgcccggac taatctaa.. .ctttggga gttaaa.gca 1200
CYP82E5V2 aggatgatta tatatagtaa aaatgtagaa tgataaatgg aaaaagatg agaacttttt gtgctcagac taatctatat atctttggga gttaaaagtg
CYP82E4V2 aggtt.cgag cctcaggtgc aaccactaat gcttgtatta gattatgttg tctgcatcat ac.cctaat tggagtgtgg ctcttcccga accct..gca

CYP82E10 cttctacca atagggactt ttcttca.ag ctgga..... t cttgatgaaactctgtggt taaaa..aaa 1300
CYP82E5V2 cttc..acca aaggggactt ttctctatag ctcaagttag aagtttgatt atagatgaaa gagtatttat cacttcacga actctgatga taaagttaa
CYP82E4V2 atgctggatg ctggatgctt tatgtatcag actgac.... .ctt tttgttaaactatctaaata ctaaggatga

CYP82E10 tgagata.ta accaattata attgatagaa taaaacttta ttaactccat tgagcataac aaaaacaaaa aaagtaaaag gacttctctct ctttttt..a 1400
CYP82E5V2 tgagata.ta accagttata attgatagaa taaaacttta ttaactccat tgagcataac aaaaacaaaa aaagtaaaag gacttctctct cttttttta
CYP82E4V2 tgatttaata aaaaatagaa atggtaaaca gaaaagatg agattatttt tggggctata tggattcggc cgggctttgg gaggtaaac ggtatctacc

CYP82E10 gggagaattt ctttgattct ttgttaa.ta tagatcctg tttttttt.atctc taataataat tggcttgaa tcaggtcggc ctgattcttg 1500
CYP82E5V2 gggagaattt ctttaattct ttgttaaata tagatcctg tttttttt cttctctg taataataat ggtcttgaa tcaagctg.ttg
CYP82E4V2 agttgaactt ttaactccaga actttatctc gagagctctg aaaaaaatg aatagtaatt taccactcca aatctttga tggtaaaaag atggatata

CYP82E10 gcttctttagc agcaatagag tcaaa..gct aatatata taabttggtt ctogaataag tcaactgaa attatateat acgggtatta aataataca 1600
CYP82E5V2 actctgttagc agcaataag tcaaa..gct aatatata taabttggtt ctogaataag tcaactgaa attatata t acgggtatta aataataca
CYP82E4V2 accctctata attgattgaa ccacgttjat agaataaac tctctta..c tccactcag cataagaaaa atgaaccaaa acgg.....a attctctct

CYP82E10 tgattattca taggatatgc tttttttart ggttaataa 1700
CYP82E5V2 ttaattctta taggatatgc tttttttart ggttaataa
CYP82E4V2 ttttca...g ggggaaattc cttaattgct tgttgaatat agattctatg cg.....t tttctattt ttaataatga tgaatatcata

CYP82E10 1800
CYP82E5V2 tatgtagacc ttaccctfac ccggaaggag tagagggatt gtttcgaaa gacctcggc tcaagaaac aaaaagagac aatctcagta ccaccaaga
CYP82E4V2 tagtcaagt taatacttat gtatattggt ttgaggaaa gctat..att ggaactatat aatacgtcta ttatagaata gtattattt agaggatata

CYP82E10a.tttttt taataataa tgaatatat aagtaagctt taatacac.t atttgatttt aacttagata aatttgcoct 1900
CYP82E5V2 tcatattatt agttaaagt ta.ttttatt gaactaaga tgaatatat agttaaagta taatacgtgt atttgatttt aacttagata aatttgcoct
CYP82E4V2 catttttttc ggataaatat ttgatttatt ggattaaaa tagaatatat agttaaagtc taatacgtgt gtttgctttt aacttaata aacttgacct

CYP82E10 cgtacatctc taagagaaga gctgaaataa atgaatt... ttaaatttca gaaaaata aattcattag tataatgaga tgtc..gata dttgacaatt 2000
CYP82E5V2 cgtacatctc taagaga.a gctgaaataa atgaatt... ttaaattt... .aaaaata aattcattag tataatgaga tgtg..cata dttgacaatt
CYP82E4V2 cgtacaattc taagaaataa ttgaaataa atgaattatt ttattgttaa tcaataaaa aatctatagt atagatgaga tgtgtgcata dttgacaata

CYP82E10 actatactaa ctagaacaag gttcagcaga tagtgcgct aaectatntt tgtattgaat tat.....tc taattftgicc acagAGTTTA 2100
CYP82E5v2 actatactaa atagaacaag gttcggcaga tagtgacact aaectacttt tgtattgaat tatccttttt aattttattc taattftgctt acagAGTTTG
CYP82E4v2 actatactaa ctaaaaaag gtatgtgaat aattgatatt ..ccttttttaattc tttttt... ccagAGTTTG

CYP82E10 GTCTGGATG CTGGGGACAC AGTIGCTCTT CACMIGAAIT GGGGATGGC ATTATTGATP AACNATCAAC ATGCCCTGAA GAAAGCCCA GAAGACATAG 2200
CYP82E5v2 GTCFNGGNG CTGGGGACAC AGTIGCTCTT CACMIGAAIT GGGGATGGC ATTACTGATA AACNATCAAC ATGCCCTGAA GAAAGCCCA GAAGAGATCG
CYP82E4v2 GTCFNGGNG CAGCAGACAC AGTIGCTCTT CACMIGAAIT GGGGATGGC ATTAATTGATA AACNATCAAA AGGCCCTGAC GAAAGCCCAA GAAGAGATAG

CYP82E10 ATAAAAAGT TGGTAAGGAT AGATGGGTAG AAGAGATGA TATTAGGAT TTGTTATACC TCCAACTAT TGTAAAGAA GTGTTACGAT TATATCCACC 2300
CYP82E5v2 ATAAAAAGT TGGTAAGGAA AGATGGGTAG AAGAGATGA TATTAGGAT TTGTTATACC TCCAACTAT TGTAAAGAA GTGTTACGAT TATATCCACC
CYP82E4v2 ACACAAAAGT TGGTAAGGAC AGATGGGTAG AAGAGATGA TATTAGGAT TTGTTATACC TCCAACTAT TGTAAAGAA GTGTTACGAT TATATCCACC

CYP82E10 GGGACCTTA TTAGTAGCCC ATGAAAATGT AGAGGATNGT GTFGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACTAGACTAT TCGCGAACGT TATGAAATTA 2400
CYP82E5v2 AGGACCTTA TTAGTAGCTC ATGAAAATGT AGAGGATNGT GTFGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACTAGACTAT TCGCGAACGT TATGAAATTA
CYP82E4v2 AGGACCTTG TTAGTAGCAC ACGAAAATGT AGAGGATNGT GTFGTAGTG GATATCACAT TCCTAAAGGG ACAAGATTAT TCGCAAACGT CATGAAACTG

CYP82E10 CAGGGGGATG CTAAACTCTG GTCAAATCCT GATAACITGG ATCCAGAGAG ATTTTCGCTT CCTGATATTG ACETTCGTTG TCAACTAT GAGTTATCC 2500
CYP82E5v2 CAGGGGGATG CTAAACTCTG GTCAAATCCT GATAACITGG ATCCAGAGAG ATTTTCGCTT GATGATATTG ACTACGGTGG TCAACTAT GAGTTATCC
CYP82E4v2 CAACGTGATC CTAAACTCTG GECTGATCCT GATACTTTGG ATCCAGAGAG ATTCATTCCT ACTGATATTG ACTTCGTTG TCAACTAT GAGTTATCC

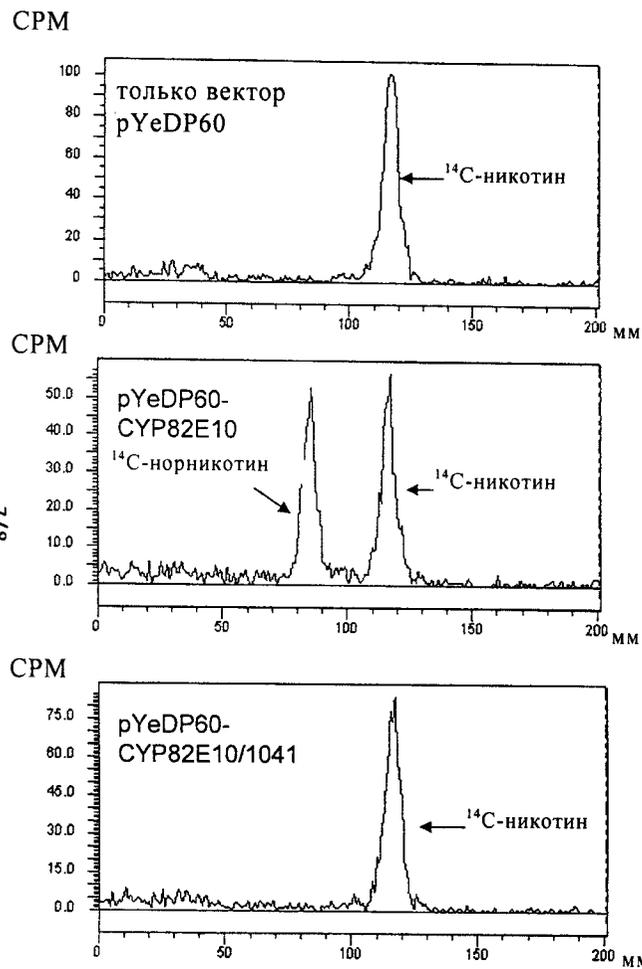
CYP82E10 CATTTCCGTC TCGAAGACGA TCTTGTCGG GATGACTTA TCCAAAGCAA GTGAGACCC TAAGAAATCG AACTTGGTC CAGGCTTCA ATTACAAAC 2600
CYP82E5v2 CATTTCCGTC TCGAAGACGA TCTTGTCGG GATGACTTA TCCAAAGCAA GTGAGACCC TAAGAAATCG AACTTGGTC CAGGCTTCA ATTACAAAC
CYP82E4v2 CATTTCGTC TCGAAGACGA TCTTGTCGG GATGACTTA TCCAAAGCAA GTGAGACCC TAAGAAATCG AACTTGGTC CAGGCTTCA ATTACAAAC

CYP82E10 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAGCA AGGTGCAGCA TTAACATATC GTAAGTAAA TCCTATAGAA GTGTAATTA CGCTCGCCT GACACCTGAG 2700
CYP82E5v2 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAGCA AGGTGCAGCA TTAACATATC GTAAGTAAA TCCTATAGAA GTGTAATTA CGCTCGCCT GACACCTGAG
CYP82E4v2 TCCAAATGAC GAGCCCTTGG ATATGAAGCA AGGTGCAGCA TTAACATATC GTAAGTAAA TCCTATAGAA GTGTAATTA CGCTCGCCT GACACCTGAG

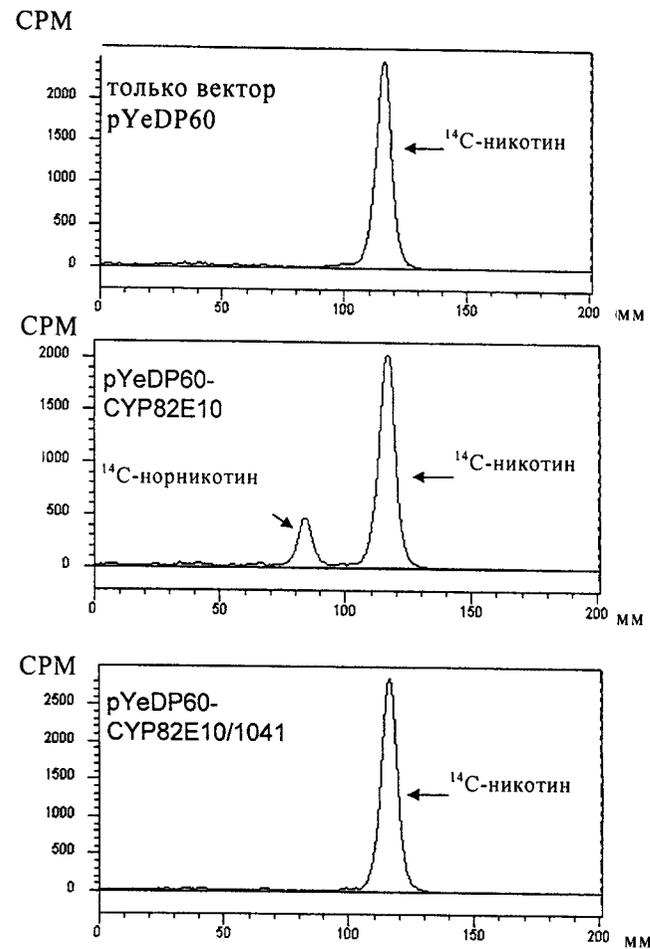
CYP82E10 CTTTATTAAA atctaagatg ttttacttfg gttgabcatt gtttaatact octagataga tgggtattca tctatctttt taaaattaat tgtcagtagc 2800
CYP82E5v2 CTTTATTAAA acettagatg ttttacttfg abttgat. t aaatataata gcagaaaaa
CYP82E4v2 CTTTATTAAA acettagatg ttttacttfg gttgabcatt gtttaatact octaaa... tgggatattca tttacccttt atcaatataat tgtcagtagc

CYP82E10 agttttctta aittggtaag tttgtaaca caagtaaga aggatgtgc tagtaata. 2860
CYP82E5v2
CYP82E4v2 agttttctta aittggtaag tttgtaaca caagtaaga ataattgtgc taataataa

Субстрат 2,45мкМ [¹⁴С]-никотин

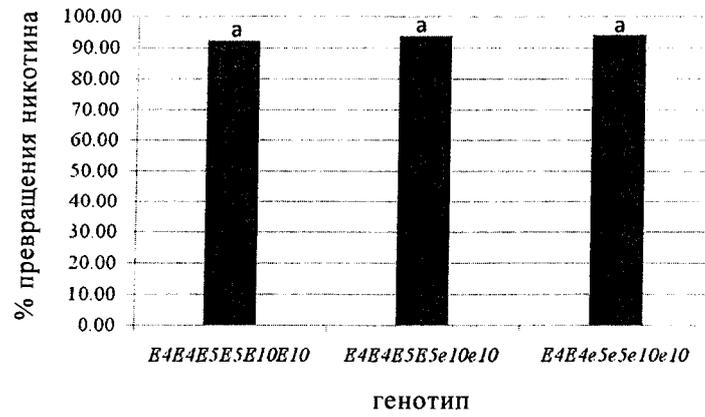


Субстрат 50мкМ [¹⁴С]-никотин



Фиг. 3

Фиг. 4А



Фиг. 4Б

