



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86341** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 15/09
C12N 15/82

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОСЛІДОВНІСТЬ ДНК, РЕКОМБІНАНТНА МОЛЕКУЛА ДНК, ЕКСПРЕСІЙНИЙ ВЕКТОР ДНК, КЛІТИНА-ХАЗЯЇН, СТАБІЛЬНО ТРАНСФОРМОВАНА ПОСЛІДОВНІСТЮ ДНК, РОСЛИНА ТА ЇЇ ПОТОМСТВО, СТАБІЛЬНО ТРАНСФОРМОВАНІ ПОСЛІДОВНІСТЮ ДНК, ТА СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОСЛІДОВНОСТІ ДНК

1

2

(21) 2002108486
(22) 26.03.2001
(24) 27.04.2009
(86) РСТ/EP01/03408, 26.03.2001
(31) 0007427.8
(32) 27.03.2000
(33) GB
(31) 0010486.9
(32) 28.04.2000
(33) GB
(31) 01101802.5
(32) 26.01.2001
(33) EP
(31) Not furnished
(32) 28.02.2001
(33) DE
(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.
(72) ХОН ТОМАС, АТ/СН, СТАВОЛОНЕ ЛІВІЯ, ІТ/СН, ДЕ ХААН ПЕТРУС ТЕОДОРУС, ЛІГОН ХОУП ТОМПСОН, КОНОНОВА МАРІЯ
(73) СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ
(56) US A 5824857, 20.10.1998.
EP A 0426641, 08.05.1991.
WO A 8402913, 02.08.1984.
(57) 1. Послідовність ДНК, яка має здатність забезпечувати експресію зв'язаної з нею нуклеотидної послідовності, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:1.
2. Послідовність ДНК за п. 1, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2.
3. Послідовність ДНК за п. 1, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:3.
4. Послідовність ДНК за п. 1, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:4.
5. Послідовність ДНК за п. 1, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:5.

6. Послідовність ДНК за п. 1, де послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:6.
7. Послідовність ДНК, яка має здатність забезпечувати експресію зв'язаної з нею нуклеотидної послідовності і яка гібридизується в строгих умовах з будь-якою з послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:6.
8. Послідовність ДНК за п. 1, де вказана послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка включає SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:20, і де вказана послідовність ДНК додатково містить на 3'-кінці нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID NO:5.
9. Послідовність ДНК за п. 1, де вказана послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка включає SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:20, і де вказана послідовність ДНК додатково містить на 5'-кінці нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID NO:6.
10. Рекombінантна молекула ДНК, яка включає послідовність ДНК за будь-яким з пп. 1-9, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес.
11. Рекombінантна молекула ДНК за п. 10, де нуклеотидна послідовність, що представляє інтерес, включає кодувальну послідовність.
12. Рекombінантна молекула ДНК за п. 11, де кодувальна послідовність кодує потрібну фенотипічну ознаку.
13. Рекombінантна молекула ДНК за п. 12, де кодувальна послідовність кодує протеїн, який забезпечує позитивну вибірову перевагу клітинам, які трансформовані вказаною кодувальною послідовністю.
14. Рекombінантна молекула ДНК за п. 12 або 13, де кодувальна послідовність кодує протеїн, який надає метаболічну перевагу клітинам, які трансформовані вказаною кодувальною послідовністю, що полягає в здатності метаболізувати сполуку,

(13) **C2**
(11) **86341**
(19) **UA**

яка являє собою манозу або ксилозу, або їх похідне, або попередник, або субстрат протеїну, або яка може метаболізуватися клітинами, які трансформовані вказаною кодувальною послідовністю, з утворенням такого субстрату.

15. Рекombінатна молекула ДНК за п. 14, де кодувальна послідовність кодує фермент, вибраний із групи, яка включає ксилоізомерази, фосфоманоізомерази, манозо-6-фосфатізомеразу, манозо-1-фосфатізомеразу, фосфоманомутазу, манозо-епімеразу, манозо- або ксилософосфатазу, манозо-6-фосфатазу, манозо-1-фосфатазу і манозо- або ксилоспермеазу.

16. Рекombінатна молекула за п. 15, де кодувальна послідовність кодує фосфоманоізомеразу.

17. Рекombінатна молекула ДНК за п. 11, у якій кодувальна ділянка є нетрансльованою.

18. Рекombінатна молекула ДНК за п. 17, де нетрансльована кодувальна ділянка походить з вірусного гена.

19. Рекombінатна молекула ДНК за п. 18, де вірусний ген походить з TSWV, зокрема з NP-гена TSWV.

20. Рекombінатна молекула ДНК за п. 11, де кодувальна послідовність знаходиться в антисмислової орієнтації.

21. Експресійний вектор ДНК, який включає послідовність ДНК за будь-яким з пп. 1-9 або рекombінантну молекулу ДНК за будь-яким з пп. 10-20.

22. Експресійний вектор ДНК за п. 21, де експресійний вектор ДНК являє собою рNOV2819.

23. Експресійний вектор ДНК за п. 21, де експресійний вектор ДНК являє собою рNOV2820.

24. Експресійний вектор ДНК за будь-яким з пп. 21-23, в якому послідовність ДНК за будь-яким з пп. 1-9 функціонально зв'язана з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес, і друга послідовність ДНК за будь-яким з пп. 1-3 функціонально зв'язана з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес.

25. Експресійний вектор ДНК за п. 24, який має здатність змінювати експресію вірусного геному.

26. Експресійний вектор ДНК за п. 25, який включає першу послідовність ДНК, що має здатність експресувати у клітині фрагмент смислової РНК вказаного вірусного геному або частини його, і

другу послідовність ДНК, що має здатність експресувати у клітині фрагмент антисмислової РНК вказаного вірусного геному або частини його, де фрагмент смислової РНК і фрагмент антисмислової РНК мають здатність утворювати дволанцюгову РНК.

27. Експресійний вектор ДНК за п. 26, де вірус вибирають із групи, яка включає тосповіруси, потівіруси, потексвіруси, тобамовіруси, лутеовіруси, кукумовіруси, бромовіруси, клостеовіруси, томбусвіруси і фузовіруси.

28. Експресійний вектор ДНК за п. 27, де послідовність ДНК містить нуклеотидну послідовність, отриману з гена протеїну вірусної оболонки, гена вірусного нуклеокапсидного протеїну, гена вірусної реплікази або гена протеїну, що забезпечує рух вірусу, або їх частин.

29. Експресійний вектор ДНК за п. 28, де послідовність ДНК одержують з вірусу плямистого в'янення томатів (TSWV).

30. Експресійний вектор ДНК за п. 29, де ДНК одержують з гена нуклеокапсидного протеїну.

31. Клітина-хазяїн, стабільно трансформована послідовністю ДНК за будь-яким з пп. 1-9 або рекombінантною молекулою ДНК за будь-яким з пп. 10-20, або експресійним вектором ДНК за будь-яким з пп. 21-30.

32. Клітина-хазяїн за п. 31, де клітина-хазяїн являє собою рослинну клітину.

33. Рослина і її потомство, стабільно трансформовані послідовністю ДНК за будь-яким з пп. 1-9 або рекombінантною молекулою ДНК за будь-яким з пп. 10-20, або експресійним вектором ДНК за будь-яким з пп. 21-30.

34. Рослина за п. 33, вибрана з групи, яка включає кукурудзу, пшеницю, сорго, жито, овес, газонну траву, рис, ячмінь, сою, бавовник, тютюн, цукровий буряк і олійний рапс.

35. Спосіб одержання послідовності ДНК за п. 1, де ДНК одержують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням принаймні одного олігонуклеотиду, який являє собою фрагмент, що складається з 15 або більше послідовних пар основ нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO:1.

Даний винахід стосується нових послідовностей ДНК, які функціонують як промотори транскрипції зв'язаних з ними нуклеотидних послідовностей у рослинах. Більш конкретно, винахід стосується нових промоторів, які забезпечують конститутивну експресію зв'язаних з ними послідовностей, що представляють інтерес.

В галузі сільського господарства постійно існує необхідність у модифікації рослин відповідно до певних потреб. Одним зі шляхів вирішення цієї задачі є застосування сучасних методів генної інженерії. Наприклад, у результаті введення в рослину гена, що представляє інтерес, рослину можна специфічно модифікувати таким чином, щоб вона набула потрібну фенотипічну ознаку. Для цього, як правило, рослини трансформують гетерологічним геном, що включає промоторну ділян-

ку, кодувальну ділянку і термінуючу ділянку. При генетичному конструюванні гетерологічного гена, призначеного для експресії в рослинах, вирішальним фактором є вибір промотору. У той час як для деяких генів доцільно, щоб їх експресія відбувалася лише у відповідь на вплив певних стимулів або була зосереджена у певних типах клітин або тканинах, для інших генів більш переважною є конститутивна експресія, тобто експресія, яка відбувається в рослині постійно й у більшій частині тканин і органів. Раніше для конститутивної експресії гетерологічних генів у рослинах широко використовували промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (промотор 35S CaMV). Однак існують ситуації, коли потрібно застосовувати альтернативні промотори. Відповідно до цього основною задачею даного винаходу є створення таких альтер-

нативних промоторів для експресії в рослинах нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес. У винаході запропоновані також рекомбінантні молекули ДНК, експресійні вектори і трансгенні рослини, які містять промотори за даним винаходом.

Відповідно до вищевикладеного у винаході запропонована: послідовність ДНК, яка має здатність здійснювати експресію зв'язаної з нею нуклеотидної послідовності, де вказану послідовність ДНК можна одержувати з геному вірусу жовтого скручування листя цестрових (SmYLCV). Переважною є послідовність ДНК, яку можна одержувати з промотору первинного транскрипту SmYLCV і яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1.

Зокрема, запропоновані наступні послідовності ДНК:

- послідовність ДНК, яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2,
- послідовність ДНК, яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:3,
- послідовність ДНК, яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:4,
- послідовність ДНК, яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:5,
- послідовність ДНК, яка включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:6,
- послідовність ДНК, яка гібридується в строгих умовах з будь-якою з послідовностей, представлених у SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:6, зокрема, коли вказана вище послідовність ДНК включає нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:19 або SEQ ID NO:20.

Винахід стосується також послідовностей ДНК, які включають фрагмент, що включає принаймні 50 послідовних нуклеотидів, що переважно включає від приблизно 400 основ до приблизно 650 основ, більш переважно від приблизно 200 основ до приблизно 400 основ і найбільш переважно приблизно 350 основ SEQ ID NO:1, при цьому послідовності ДНК мають здатність забезпечувати експресію зв'язаних з ними нуклеотидних послідовностей.

Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення послідовність фрагмента, що включає принаймні 50 послідовних нуклеотидів, що переважно включає від приблизно 400 основ до приблизно 650 основ, більш переважно від приблизно 200 основ до приблизно 400 основ і найбільш переважно приблизно 350 основ, принаймні на 75%, переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 95% ідентична до послідовності фрагмента, що включає принаймні 50 послідовних нуклеотидів, переважно включає від приблизно 400 основ до приблизно 650 основ, більш переважно від приблизно 200 основ до приблизно 400 основ і найбільш переважно приблизно 350 основ SEQ ID NO:1.

Винахід стосується також рекомбінантних молекул ДНК, які включають ділянку промотору первинного транскрипту, виділену з вірусу жовтого скручування листя цестрових. Крім того, у винаході запропоновані рекомбінантні молекули ДНК і касети експресії ДНК, які включають послідовність

ДНК за винаходом, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, яка представляє інтерес. Винахід стосується також експресійних векторів ДНК, які включають рекомбінантну ДНК і касети експресії відповідно.

Зокрема, запропоновані рекомбінантні молекули ДНК і касети експресії ДНК, у яких нуклеотидна послідовність, що представляє інтерес, включає кодувальну ділянку, насамперед

- кодувальну послідовність, яка кодує необхідну фенотипічну ознаку,

- кодувальну послідовність, яка кодує ген селектованого або придатного для скринінгу маркера,

- кодувальну послідовність, яка кодує протеїн, що зумовлює стійкість до антибіотиків, стійкість до вірусів, стійкість до комах, стійкість до хвороб або стійкість до інших шкідників, толерантність до гербіцидів, підвищену поживну цінність, поліпшені характеристики при промисловій переробці або змінену репродуктивну здатність,

- кодувальну послідовність, яка кодує протеїн, що надає позитивну вибірку перевагу клітинам, трансформованим вказаною кодувальною послідовністю,

- кодувальну послідовність, яка кодує протеїн, що надає метаболічну перевагу клітинам, трансформованим вказаною кодувальною послідовністю, яка полягає в здатності здійснювати метаболізм сполуки, де сполука представляє собою манозу або ксилозу або їх похідне або попередник, або субстрат протеїну, або яка може метаболізуватися клітинами, трансформованими кодувальною послідовністю, з утворенням такого субстрату,

- кодувальну послідовність, яка кодує фермент, вибраний із групи, яка включає ксилізоізомерази, фосфомано-ізомеразу, манозо-6-фосфат-ізомеразу, манозо-1-фосфат-ізомеразу, фосфомано-мутази, манозо-епімеразу, манозо- або ксилозо-фосфатазу, манозо-6-фосфатазу, манозо-1-фосфатазу і манозо- або ксилозо-пермеазу,

- кодувальну послідовність, яка кодує фосфомано-ізомеразу,

- кодувальну ділянку, яка є нетрансльованою,

- нетрансльовану кодувальну ділянку, з вірусного геному, зокрема з TSWV (вірусу плямистого в'янення томатів), більш переважно з NP-гена TSWV,

- кодувальну послідовність, яка кодує в рослинах важливі з комерційної точки зору ферменти або метаболіти,

кодувальну послідовність, яка знаходиться в антисмисловій орієнтації.

Винахід стосується також експресійних векторів ДНК, які включають вказані вище послідовності ДНК або рекомбінантну молекулу ДНК. У конкретному варіанті здійснення винаходу експресійний вектор ДНК представляє собою pNOV2819 або pNOV2819. Крім того, винахід стосується експресійних векторів ДНК, які включають першу послідовність ДНК за винаходом, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес, і другу послідовність ДНК за винаходом, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес. Від-

повідно до конкретного варіанта здійснення винаходу вказані вище експресійні вектори ДНК мають здатність змінювати експресію вірусного геному.

Згідно із ще одним конкретним варіанту здійснення вказаний вище експресійний вектор ДНК включає першу послідовність ДНК, яка має здатність забезпечувати експресію в клітині фрагмента смислової РНК вірусного геному або його частини, і другу послідовність ДНК, що має здатність забезпечувати експресію в клітині фрагмента антисмислової РНК вірусного геному або його частини, причому фрагмент смислової РНК і фрагмент антисмислової РНК мають здатність утворювати дволанцюгову РНК.

У винаході запропоновані експресійні вектори, які відрізняються тим,

що

- вірус вибирають із групи, яка включає тоспівіруси, потексвіруси, тобамовіруси, лутеовіруси, кукумовіруси, бромовіруси, кластеровіруси, томбуловіруси і фуловіруси,

- послідовності ДНК включають нуклеотидну послідовність, яка походить з гена протеїну вірусної оболонки, гена вірусного нуклеокапсидного протеїну, гена вірусної реплікази або гена протеїну, що забезпечує рух вірусу, або їх частин,

- послідовність ДНК одержують з вірусу плямистого в'янення томатів (TSWV),

- послідовність ДНК одержують з гена нуклеокапсидного протеїну.

Винахід стосується також клітин-хазяїнів, стабільно трансформованих послідовністю ДНК, рекомбінантною молекулою ДНК або експресійним вектором ДНК за винаходом. Зокрема, де

- клітина-хазяїн представляє собою бактерію,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину, вибрану з групи, яка включає клітини рису, кукурудзи, пшениці, ячмені, жита, солодкої картоплі, цукрової кукурудзи, бобів, гороху, цикорію, салату, капусти, цвітної капусти, брокколі, турнепсу, редису, шпинату, спаржі, цибулі, часнику, перцю, селери, гарбуза великоплідного, гарбуза пепи, конопі, цукіні, яблуні, груші, айви, дині, сливи, вишні, персика, нектарина, абрикоса, суниці, винограду, малини, ожини, ананаса, авокадо, папайї, манго, банана, сої, томатів, сорго, цукрового очерету, цукрового буряка, соняшника, рапсу, конюшини, тютюну, моркви, бавовнику, люцерни, картоплі, баклажана, огірка, *Arabidopsis thaliana* і деревних рослин, таких як хвойні і листяні дерева, але насамперед, рису, кукурудзи, пшениці, ячменю, капусти, цвітної капусти, перцю, гарбуза великоплідного, дині, сої, томатів, цукрового буряка, соняшника або бавовнику, переважно рису, кукурудзи, пшениці, *Sorghum bicolor*, їжі збірної, цукрового буряка і сої,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину дводольної рослини,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину дводольної рослини, вибраної з групи, яка включає сою, бавовник, тютюн, цукрову буряк і олійний рапс,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину однодольної рослини,

- клітина-хазяїн представляє собою рослинну клітину однодольної рослини, вибраної з групи, яка включає кукурудзу, пшеницю, сорго, жито, овес, газонну траву, рис і ячмінь.

Крім того, винахід стосується рослин і їх потомства, включаючи насіння, стабільно трансформованих послідовністю ДНК, рекомбінантною молекулою ДНК або експресійним вектором ДНК за винаходом. Зокрема, де

- рослини вибирають із групи, яка включає рис, кукурудзу, пшеницю, ячмінь, жито, солодку картоплю, цукрову кукурудзу, боби, горох, цикорій, салат, капусту, цвітну капусту, брокколі, турнепс, редис, шпинат, спаржу, цибулю, часник, перець, селеру, гарбуз великоплідний, гарбуз пепи, конопі, цукіні, яблуню, грушу, айву, диню, сливу, вишню, персик, нектарин, абрикос, суницю, виноград, малину, ожину, ананас, авокадо, папайю, манго, банан, сою, томати, сорго, цукровий очерет, цукровий буряк, соняшник, рапс, конюшину, тютюн, моркву, бавовник, люцерну, картоплю, баклажан, огірок, *Arabidopsis thaliana* і деревні рослини, такі як хвойні і листяні дерева, але насамперед рис, кукурудзу, пшеницю, ячмінь, капусту, цвітну капусту, перець, гарбуз великоплідний, диню, сою, томати, цукровий буряк, соняшник або бавовник, переважно рис, кукурудзу, пшеницю, *Sorghum bicolor*, їжу збірну, цукровий буряк і сою.

У винаході описано також

- застосування послідовності ДНК за винаходом для експресії нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес,

- спосіб одержання послідовності ДНК за винаходом, де ДНК одержують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, причому принаймні один із застосовуваних олігонуклеотидів включає послідовність нуклеотидів, що представляє собою фрагмент, який включає 15, 18, 20, 22, 24 або більше послідовних пар основ SEQ ID NO:1.

З метою більш ясного і правильного розуміння опису і формули винаходу нижче наведені наступні визначення:

SmYLCV: вірус жовтого скручування листя цестрових.

Перебудова ДНК: перебудова ДНК представляє собою метод, призначений для швидкої, простої і ефективної інтродукції перерозподілів, переважно випадковим чином, у молекулу ДНК або для одержання обмінів послідовностями ДНК між двома або більшою кількістю молекул ДНК, переважно випадковим чином. Молекула ДНК, отримана в результаті перебудови ДНК, є перебудованою молекулою ДНК, яка представляє собою молекулу ДНК, що не зустрічається в природних умовах, отриману на основі принаймні однієї молекули ДНК-матриці.

Експресія: означає транскрипцію і/або трансляцію ендогенного гена або трансгена в рослині. У випадку, наприклад, антисмислових конструкцій поняття "експресія" може стосуватися транскрипції лише антисмислової ДНК.

Функціонально еквівалентна послідовність: означає послідовність ДНК, яка має промоторну активність, практично аналогічну активності промотору первинного транскрипту SmYLCV або його частини і яка гібридується в строгих умовах із

вказаними промоторними послідовностями.

Ген: означає кодувальну послідовність і зв'язану з нею регуляторну послідовність, причому кодувальна послідовність транскрибується з утворенням РНК, такої як мРНК, рРНК, тРНК, snРНК (М.я.РНК), смислова РНК або антисмислова РНК. Прикладами регуляторних послідовностей є промоторні послідовності, 5'- і 3'-нетрансльовані послідовності і термінуючі послідовності. Можуть бути присутніми інші елементи, наприклад, інтрони.

Ген, що представляє інтерес: означає будь-який ген, який при перенесенні в рослину надає рослині потрібну властивість, таку як стійкість до антибіотиків, стійкість до вірусів, стійкість до комах, стійкість до хвороб або стійкість до інших шкідників, толерантність до гербіцидів, підвищену поживну цінність, поліпшені характеристики при промисловій переробці або змінену репродуктивну здатність. «Ген, що представляє інтерес» може також представляти собою ген, який переносять у рослини для одержання в них цінних комерційної точки зору ферментів або метаболітів.

Гетерологічний: у контексті даного опису означає відмінний від такого, що зустрічається в природних умовах або синтетичного походження. Наприклад, якщо клітину-хазяїна трансформують нуклеотидною послідовністю, яка не зустрічається в нетрансформованій клітині-хазяїні, то вважається, що нуклеотидна послідовність є гетерологічною відносно клітини-хазяїна. Застосовувана для трансформації нуклеїнова кислота може містити гетерологічний промотор, гетерологічну кодувальну послідовність або гетерологічну термінуючу послідовність. В іншому варіанті застосовувана для трансформації нуклеїнова кислота може бути повністю гетерологічною або може включати будь-яку можливу комбінацію гетерологічних і ендогенних нуклеотидних послідовностей.

Лідерна ділянка: ділянка гена між сайтом ініціації транскрипції і сайтом ініціації трансляції.

Маркерний ген: стосується гена, який кодує селектовану ознаку або ознаку, яку можна виявляти шляхом скринінгу.

Функціонально зв'язаний/з'єднаний з: вважається, що регуляторна послідовність ДНК «функціонально зв'язана з» або «з'єднана з» послідовністю ДНК, яка кодує РНК або протеїн, якщо дві послідовності розташовані так, що регуляторна послідовність ДНК впливає на рівень експресії кодувальної послідовності ДНК.

Рослина: стосується будь-якої рослини, зокрема насіннєвого матеріалу рослин.

Рослинна клітина: структурна і фізіологічна одиниця рослини, яка включає протопласт і клітинну оболонку. Рослинна клітина може знаходитися у формі виділеної окремої клітини або культивованої клітини або представляти собою частину високоорганізованої одиниці, такої, наприклад, як тканина рослини або орган рослини.

Рослинний матеріал: стосується листя, стебел, коренів, квітів або частин квітів, плодів, пилку, пилкових трубок, насінних зачатків, зародкових мішків, яйцеклітин, зигот, зародків, насіння, відсадків, культур клітин або тканин або будь-якої іншої частини або продукту рослини.

Промотор: означає послідовність ДНК, яка іні-

ціює транскрипцію зв'язаної з нею послідовності ДНК. Промоторна ділянка може також включати елементи, які діють як регулятори експресії гена, такі як активатори, енхансери і/або репресори, і може включати всю 5'-нетрансльовану лідерну послідовність або її частину.

Рекомбінантна молекула ДНК: комбінація послідовностей ДНК, які з'єднані разом за допомогою методу рекомбінатної ДНК.

Метод рекомбінатної ДНК: процедури, застосовувані для об'єднання послідовностей ДНК, описані, наприклад, у Sambrook і ін., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Маркерний ген, який можна виявляти шляхом скринінгу (придатний для скринінгу маркерний ген): стосується гена, експресія якого не надає вибіркової переваги трансформованій клітині, але експресія якого приводить до фенотипічної відмінності трансформованої клітини від нетрансформованих клітин.

Селектований маркерний ген: означає ген, експресія якого в клітині рослини надає клітині вибіркової переваги. Вибіркова перевага, яку мають клітини, трансформовані селектованим маркерним геном, у порівнянні з нетрансформованими клітинами може полягати в їх здатності рости в присутності негативного агента селекції, такого як антибіотик або гербіцид. Вибіркова перевага, яку мають трансформовані клітини в порівнянні з нетрансформованими клітинами, може полягати в їх посиленій або знову набутій здатності використовувати додану сполуку як поживну речовину, фактор росту або енергетичне джерело. Поняття "селектований маркерний ген" стосується також гена або комбінації генів, експресія яких у рослинній клітині в присутності селективного агента в порівнянні з відсутністю селективного агента, позитивно впливає на трансформовану рослинну клітину і негативно впливає на нетрансформовану рослинну клітину, наприклад, у відношенні росту, що надає трансформованій рослинній клітині позитивну вибірку перевагу.

Ідентичність послідовностей: відсоток ідентичності послідовностей визначають з використанням комп'ютерних програм, заснованих на алгоритмах динамічного програмування. Комп'ютерні програми, які є переважними для застосування в рамках даного винаходу, включають комплекс пошукових програм BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), призначених для дослідження будь-яких доступних баз даних про послідовності незалежно від того, чи представляє собою розглянута послідовність амінокислотну послідовність протеїну або послідовність ДНК. Версію BLAST 2.0 (версія BLAST, у якій враховуються проломи) цього комплексу програм можна одержати Інтернетом (сайт, який зараз функціонує: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Цей комплекс програм заснований на евристичному алгоритмі, призначеному для локального пошуку на відміну від алгоритмів глобального порівняння, і тому дозволяє встановлювати зв'язок між послідовностями, які мають лише ізольовані ділянки. Бали, що одержують з використанням пошукових програм BLAST, добре піддаються статистичній інтерпре-

тації. Для таких програм як необов'язкові параметри переважно використовують параметри, що задаються за замовчуванням.

Трансформація: стосується інтродукції нуклеїнової кислоти в клітину. Зокрема, поняття стосується стабільної інтеграції молекули ДНК у геном організму, що представляє інтерес.

TSWV: вірус плямистого в'янення томатів.

Даний винахід стосується послідовностей ДНК, які одержують з геному вірусу жовтого скручування листя цестрових (CmYLCV). Переважними є послідовності ДНК, які одержують із промотору первинного транскрипту CmYLCV, що має здатність забезпечувати експресію зв'язаної з ним нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес. Під обсяг винаходу підпадають також функціональні і/або структурні еквіваленти послідовностей ДНК. Таким чином, винахід стосується послідовностей ДНК, які функціонують як промотори транскрипції зв'язаних з ними нуклеотидних послідовностей. Промоторна ділянка може включати також елементи, які діють як регулятори експресії генів, такі як активатори, енхансери і/або репресори, і можуть включати 5'-нетрансльовану лідерну послідовність транскрибованої мРНК.

Відповідно до переважного варіанту здійснення винаходу послідовність ДНК забезпечує конститутивну експресію зв'язаної з нею нуклеотидної послідовності. Поняття «конститутивна експресія» означає, що експресія нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес, відбувається в усі моменти часу і практично у всіх тканинах і органах. При аналізі короткочасної експресії при використанні як зв'язаної послідовності репортерного гена GUS або CAT встановлено, що послідовність ДНК за винаходом забезпечує високий рівень експресії репортерного гена GUS або CAT. Таким чином, послідовність ДНК за винаходом можна застосовувати для забезпечення високого рівня експресії зв'язаної з нею нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес, що переважно представляє собою кодувальну послідовність. Як очевидно фахівцю в даній галузі, зв'язану кодувальну послідовність, що представляє інтерес, можна експресувати у смисловій і антисмисловій орієнтації. Крім того, кодувальна послідовність, що представляє інтерес, може бути гетерологічною або гомологічною відносно рослини, яка підлягає трансформації. У випадку гомологічної кодувальної послідовності, послідовність ДНК за винаходом можна застосовувати для ектопічної експресії вказаної послідовності. Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення винаходу експресія кодувальної послідовності, що представляє інтерес, під контролем послідовності ДНК за винаходом пригнічує власну експресію і вихідну копію гена шляхом процесу, що називається косупресією.

Промотори за даним винаходом можна одержувати з геномної ДНК вірусу жовтого скручування листя цестрових (CmYLCV), яку можна виділяти, наприклад, із заражених рослин *Cestrum parqui*. Уражені CmYLCV рослини *Cestrum parqui* виявляють за наявності листової мозаїки і деформованих зморшкуватих листків. Потім цю ДНК секвенують і аналізують. Порівняння послідовності з послідовностями в базі даних дозволило встано-

вити, що геномна організація CmYLCV відповідає одному з інших представників родини *Caulimovirus*. CmYLCV містить 8 відкритих рамок зчитування. Порівняння послідовності продуктів гена CmYLCV виявило, що продукт гена I бере участь у русі всередині клітини; ген A кодує невеликий протеїн невідомої функції; ген B кодує фактор, необхідний для перенесення вірусу попелицями; ген C кодує протеїн, зв'язаний з віріоном; ген IV кодує основний капсидний протеїн; ген V кодує зворотну транскриптазу і ген VI активує в транс-орієнтації трансляцію первинного транскрипту вірусних генів. Найбільший інтерес представляє так званий промотор первинного транскрипту CmYLCV.

Як очевидно фахівцю в даній галузі, відповідно до винаходу можна застосовувати різні ділянки промотору первинного транскрипту CmYLCV. Одним з конкретних варіантів здійснення винаходу є ділянка промотору первинного транскрипту CmYLCV, представлена в SEQ ID NO:1, позначена як промотор CmpD. Ця ділянка включає 350 пар основ промотору первинного транскрипту CmYLCV і 320 пар основ 5'-нетрансльованої лідерної послідовності первинного транскрипту CmYLCV. Цю послідовність одержують секвенуванням геномної ДНК CmYLCV. Проморну і лідерну послідовності відповідно ідентифікують шляхом порівняння з послідовностями бази даних. Варіант SEQ ID NO:1, позначений як CmpE, у якому 5'-нетрансльована лідерна послідовність первинного транскрипту CmYLCV включає 318 пар основ замість 320 пар основ, наведений у SEQ ID NO:19.

Одним із переважних об'єктів винаходу є послідовність ДНК, представлена в SEQ ID NO:2, позначена як промотор CmpC. Промотор CmpC представляє собою фрагмент послідовності, наведеної в SEQ ID NO:1, і включає 346 пар основ промотору первинного транскрипту CmYLCV, що відповідають основам 5-350 SEQ ID NO:1. Цю послідовність ДНК одержують за допомогою ПЛР із використанням геномної ДНК вірусу жовтого скручування листя цестрових або заражених вірусом жовтого скручування листя цестрових рослин *Cestrum parqui* за допомогою прямого праймера Cmp1 (SEQ ID NO:13) і зворотного праймера CmpC2 (SEQ ID NO:14). Передбачуваний TATA-бокс промотору CmpC розташований від основи 308 до основи 315 SEQ ID NO:2. Промотор CmpC включає принаймні 3 передбачувані енхансерні ділянки. Енхансерна ділянка 1, що має нуклеотидну послідовність CAAT, розташована від основи 232 до основи 235 SEQ ID NO:2, а енхансерна ділянка 2, яка також має нуклеотидну послідовність CAAT, розташована від основи 243 до основи 246 SEQ ID NO:2. Енхансерна ділянка 3 розташована від основи 246 до основи 253 SEQ ID NO:2 і має нуклеотидну послідовність TGACGTAA.

Ще одним переважним об'єктом винаходу є ДНК, наведена в SEQ ID NO:3, позначена як промотор CmpS. Промотор CmpS також представляє собою фрагмент послідовності, наведеної в SEQ ID NO:1, і включає 346 пар основ SEQ ID NO:2 плюс 54 пари основ лідерної ділянки промотору первинного транскрипту CmYLCV. Лідерна ділянка представляє собою нуклеотидну послідовність, розташовану перед кодувальною послідовністю,

що транскрибується, але не транслюється з утворенням протеїну. Фахівцю в даній галузі відомо, що лідерна ділянка може містити регуляторні елементи, які мають важливі функції при експресії гена. Промотор CmpS одержують за допомогою ПЛР із використанням геномної ДНК вірусу жовтого скручування листя цестрових або з заражених вірусом жовтого скручування листя цестрових рослин *Cestrum parqui* за допомогою прямого праймера Cmp1 (SEQ ID NO:13) і зворотного праймера CmpS2 (SEQ ID NO: 15). Промотор CmpS включає принаймні 2 передбачувані енхансерні ділянки в лідерній ділянці. Енхансерна ділянка 4 (GAGAGA) розташована від основи 354 до основи 359 SEQ ID NO:3, а енхансерна ділянка 5 (GAGAGAGA) розташована від основи 368 до основи 375 SEQ ID NO:3.

Ще одним із переважних об'єктів винаходу є послідовність, представлена в SEQ ID NO:4, позначена як промотор Cmp1. Як і попередній промотор, промотор Cmp1 представляє собою фрагмент послідовності, наведеної в SEQ ID NO:1, і включає 346 пар основ SEQ ID NO:2 плюс 288 пар основ 5'-лідерної послідовності первинного транскрипту CmYLCV. Промотор Cmp1 одержують за допомогою ПЛР із використанням геномної ДНК вірусу жовтого скручування листя цестрових або заражених вірусом жовтого скручування листя цестрових рослин *Cestrum parqui* за допомогою прямого праймера Cmp1 (SEQ ID NO:13) і зворотного праймера Cmp12 (SEQ ID NO: 16). Варіант SEQ ID NO:4, позначений як CmpF, у якому 5'-нетрансльована лідерна послідовність первинного транскрипту CmYLCV включає 286 пар основ замість 288 пар основ, наведений у SEQ ID NO:12.

Як відомо фахівцю в даній галузі, нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 19 і 20, можна подовжувати на їх 5' і 3'-кінцях за допомогою гомологічних або гетерологічних нуклеотидних послідовностей. Наприклад, 5'-кінець SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 19 і 20 можна подовжувати за допомогою всієї або частини нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:6. SEQ ID NO:6 у природних умовах розташована проти ходу транскрипції відносно SEQ ID NO:2, 3, 4 і 20 і включає частину BP3 VI CmYLCV (основи 1-100 SEQ ID NO:6), а також частину промотору первинного транскрипту CmYLCV (основи 101-104 SEQ ID NO:6). Аналогічно до цього 3'-кінці SEQ ID NO:2, 3, 4 і 20 можна подовжувати з використанням усієї або частини нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:5, що представляє собою нуклеотидну послідовність, яка у природних умовах зустрічається на 3' SEQ ID NO:4 і 20 і включає лідерну послідовність первинного транскрипту CmYLCV.

Як вказано вище, послідовності ДНК за винаходом можна, наприклад, одержувати за допомогою ПЛР із використанням геномної ДНК вірусу жовтого скручування листя цестрових або заражених вірусом жовтого скручування листя цестрових рослин *Cestrum parqui*. Альтернативно до цього послідовності ДНК за винаходом можна одержувати з будь-якого іншого вірусу родини *Caulimovirus*, що має послідовності, гомологічні послідовності ДНК за винаходом, за допомогою специфічних для послідовності праймерів. Як очевидно фахівцю в

даній галузі, ґрунтуючись на нуклеотидних послідовностях, представлених у SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:6 і SEQ ID NO:19 і 20, можна вибрати будь-яку комбінацію праймерів, що представляє інтерес, для ПЛР-ампліфікації фрагментів ДНК різної довжини, які можна застосовувати відповідно до винаходу. Таким чином, винахід включає фрагменти, отримані з промоторів первинного транскрипту CmYLCV, що мають потрібну функцію за винаходом, тобто мають здатність забезпечувати експресію зв'язаних з ними нуклеотидних послідовностей.

Це можна тестувати шляхом створення таких промоторних фрагментів, злиття їх із селектованим маркерним геном або придатним для скринінгу маркерним геном і аналізу злитих конструкцій у відношенні збереження промоторної активності. Такі аналізи знаходяться в компетенції фахівця в даній галузі. Переважні фрагменти ДНК за винаходом включають принаймні 50 основ, переважно від приблизно 400 основ до приблизно 650 основ, більш переважно від приблизно 200 до приблизно 400 основ і найбільш переважно приблизно 350 основ.

Як також очевидно фахівцю в даній галузі, послідовності SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 і 6 або їх більш довгі або короткі фрагменти, виведені на основі інформації про послідовність, за допомогою методів, відомих у даній галузі, можна змінювати за допомогою мутації, інсерції, делеції і/або заміни одного або декількох нуклеотидів або більш довгих або більш коротких фрагментів. Крім того, немодифіковану або модифіковану нуклеотидну послідовність за даним винаходом можна змінювати шляхом перебудови послідовності за винаходом. Для оцінки функціональної активності варіантів послідовностей ДНК за винаходом послідовність, що представляє інтерес, функціонально зв'язують із селектованим маркерним геном або придатним для скринінгу маркерним геном і оцінюють експресію маркерного гена шляхом аналізів короткочасної експресії з використанням протопластів або стабільно трансформованих рослин.

Як очевидно фахівцю в даній галузі, послідовності ДНК, що мають здатність забезпечувати експресію зв'язаних з ними нуклеотидних послідовностей, функціонують різним чином. Так, рівні експресії при використанні більш коротких фрагментів ДНК можуть відрізнятися від рівнів експресії, які забезпечуються більш довгим фрагментом, і можуть відрізнятися один від одного. Наприклад, делеція розташованого проти ходу транскрипції елемента, що виявляє понижуючу регуляцію, може приводити до підвищення рівнів експресії зв'язаної нуклеотидної послідовності, у той час як делеція елемента, що виявляє підвищуючу регуляцію, може приводити до зниження рівнів експресії зв'язаної нуклеотидної послідовності. Як також очевидно фахівцю в даній галузі, делеція специфічного для певної стадії розвитку або тканинносередовищного елемента може приводити до зміни часового або просторового профілю експресії зв'язаної нуклеотидної послідовності.

Під обсяг даного винаходу підпадають також функціональні еквіваленти промоторів за даним винаходом, тобто нуклеотидні послідовності, які

гібридизуються в строгих умовах з будь-якою з послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:6, наприклад, послідовності, представлені в SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:20. Гібридизацію в строгих умовах здійснюють при температурі 65°C, переважно при 60°C і найбільш переважно при 55°C, у забуференому цитратному фізіологічному розчині (SSC) подвійної міцності (2X), що містить 0,1% ДЧН, з наступним відмиванням основи при такій же температурі, але з використанням буфера зі зниженою концентрацією SSC. Такі буфери зі зниженою концентрацією, як правило, являють собою SSC 1/10 міцності (0,1XSSC), що містить 0,1% ДЧН, переважно 0,2X SSC, що містить 0,1% ДЧН і найбільш переважно SSC половинної міцності (0,5XSSC), що містить 0,1% ДЧН. Фактично функціональні еквіваленти всього промотору первинного транскрипту CmYLCV або його частини з інших організмів можна створювати шляхом гібридизації будь-якої з послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:19 або SEQ ID NO:20 з геномної ДНК, виділеної з організму, що представляє інтерес, насамперед іншого представника родини *Caulimovirus*. Фахівцю в даній галузі відомі методи, за допомогою яких можна виявляти такі послідовності, оскільки існує багато відомих методик ідентифікації гомологічних послідовностей в інших організмах. Такі знову виявлені молекули ДНК потім можна секвенувати і їх послідовність порівнювати з будь-якою з послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:19 або SEQ ID NO:20 і оцінювати промоторну активність. Під обсяг даного винаходу підпадають молекули ДНК, послідовність яких принаймні на 75%, переважно на 80%, більш переважно на 90% і найбільш переважно на 95% ідентична до будь-якої з нуклеотидних послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6 довжиною принаймні 50 нуклеотидів. Відсоток ідентичності послідовностей визначають з використанням комп'ютерних програм, заснованих на алгоритмах динамічного програмування. Комп'ютерні програми, які є переважними для застосування в рамках даного винаходу, включають комплекс пошукових програм BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), призначених для дослідження будь-яких доступних баз даних про послідовності незалежно від того, чи представляє собою розглянута послідовність амінокислотну послідовність протеїну чи послідовність ДНК. Версію BLAST 2.0 (версія BLAST, у якій враховуються проломи) цього комплексу програм можна одержати в Інтернеті (сайт, який зараз функціонує: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Цей комплекс програм заснований на евристичному алгоритмі, призначеному для локального пошуку на відміну від алгоритмів глобального порівняння і тому дозволяє встановлювати зв'язок між послідовностями, що мають лише ізольовані ділянки. Бали, одержувані з використанням пошукових програм BLAST, добре піддаються статистичній інтерпретації. Для таких програм як необов'язкові параметри переважно використовувати параметри, що

задаються за замовчуванням.

Ще одним об'єктом даного винаходу є рекомбінантні молекули ДНК, які містять послідовність ДНК за винаходом, функціонально зв'язану з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес. Нуклеотидна послідовність, що представляє інтерес, може, наприклад, кодувати рибосомну РНК, антисмислову РНК або будь-який інший тип РНК, який не трансклюється з утворенням протеїну. Відповідно до іншого переважного об'єкта винаходу нуклеотидна послідовність, що представляє інтерес, трансклюється з утворенням продукту-протеїну. Нуклеотидна послідовність, зв'язана з промоторною послідовністю, може бути гомологічною або гетерологічною відносно рослини, яка підлягає трансформації. Послідовність може також бути повністю або частково синтетичною. Незалежно від походження, зв'язана послідовність ДНК повинна експресуватися в трансформованій рослині залежно від експресійних властивостей промотору, з яким вона зв'язана. У випадку гомологічних нуклеотидних послідовностей, зв'язаних із промоторною послідовністю, промотор за винаходом можна застосовувати для ектопічної експресії вказаних гомологічних послідовностей. Поняття «ектопічна експресія» означає, що зв'язана з промотором нуклеотидна послідовність експресується в тканинах і органах і/або в моменти часу, у яких/коли вона не може експресуватися під контролем власного промотору. Відповідно до переважного варіанта здійснення експресія зв'язаної з промотором нуклеотидної послідовності пригнічує її власну експресію й експресію вихідної копії гена шляхом процесу, що називається косупресією.

Відповідно до переважного варіанту здійснення винаходу зв'язана нуклеотидна послідовність може кодувати протеїн, експресія якого в рослині повинна відбуватися в будь-який час і в більшості тканин і органів. Такі нуклеотидні послідовності переважно кодують протеїни, які зумовлюють потрібну фенотипічну ознаку в трансформованих рослин. Прикладами є нуклеотидні послідовності, що кодують протеїни, які зумовлюють стійкість до антибіотиків, стійкість до вірусів, стійкість до комах, стійкість до хвороб або стійкість до інших шкідників, толерантність до гербіцидів, підвищену поживну цінність, поліпшені характеристики при промисловій переробці або змінену репродуктивну здатність. Зв'язана нуклеотидна послідовність може також представляти собою послідовність, яку переносять у рослини для одержання в них цінних з комерційної точки зору ферментів або метаболітів. Під обсяг даного винаходу підпадають також селектовані маркерні гени або придатні для скринінгу маркерні гени, тобто гени, які включають послідовність ДНК за винаходом, функціонально зв'язану з кодувальною ділянкою, яка кодує селектовану ознаку або ознаку, яку можна виявляти шляхом скринінгу.

Приклади селектованих маркерних генів або придатних для скринінгу маркерних генів описані нижче. Для певних видів-мішеней переважними можуть бути різні маркери для селекції за ознакою стійкості до антибіотика або гербіциду. Звичайно застосовувані для трансформації маркери для селекції включають ген *prtII*, який надає стійкість

до канаміцину, паромоміцину, генетицину і споріднених антибіотиків (Vierra і Messing, *Gene*, 19: 259-268 (1982); Bevan і ін., *Nature* 304: 184-187 (1983)), бактеріальний ген *aadA*, який кодує аміноглікозид-3'-аденілтрансферазу й зумовлює стійкість до стрептоміцину або спектиноміцину (Goldschmidt-Clermont M., *Nucl. Acids Res.* 19: 4083-4089 (1991)), ген *hph*, який надає стійкість до антибіотика гігromіцину (Blochinger і Diggelmann, *Mol. Cell Biol.*, 4: 2929-2931, 1984)), і ген *dhfr*, який надає стійкість до метотрексату (Bourouis і ін., *EMBO J.*, 2(7): 1099-1104 (1983)). Інші маркери, які можна використовувати, включають ген фосфінотрицин-ацетилтрансферази, який зумовлює стійкість до гербіциду фосфінотрицину (White і ін., *Nucl. Acids Res.* 18: 1062 (1990); Spencer і ін., *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631 (1990)), мутантний ген EPSP-синтази, який кодує стійкість до гліфосату (Hinchey і ін., *Bio/Technology* 6: 915-922 (1988)), мутантний ген ацетолактатсинтази (ALS), який зумовлює стійкість до імідазоліону або сульфонілсечовини (Lee і ін., *EMBO J.*, 7: 1241-1248 (1988)), мутантний ген *psbA*, який зумовлює стійкість до атразину (Smeda і ін., *Plant Physiol.* 103: 911-917 (1993)), або мутантний ген протопорфіриногеноксидази, описаний в EP 769059. Ідентифікацію трансформованих клітин можна здійснювати також за допомогою експресії придатних для скринінгу маркерних генів, таких як гени, які кодують хлорамфеніколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронідазу (GUS), люциферазу і зелений флуоресцентний протеїн (GFP) або будь-який інший протеїн, який зумовлює фенотипічно розрізнявану ознаку в трансформованих клітин. Можна застосовувати також маркери для селекції, які дозволяють здійснювати позитивний відбір, такі як ген фосфоманозо-ізомерази, описаний у заявці на патент WO 93/05163. Інші гени, які можна застосовувати для позитивного відбору, описані у WO 94/20627, вони кодують ксило-ізомерази і фосфомано-ізомерази, такі як манозо-6-фосфат-ізомераза і манозо-1-фосфат-ізомераза; фосфоманомутаза; манозо-епімерази, які перетворюють вуглеводи в манозу або манозу у вуглеводи, такі як глюкоза або галактоза; фосфатази, такі як манозо- або ксилозо-фосфатаза, манозо-6-фосфатаза і манозо-1-фосфатаза, і пермеази, які беруть участь у транспорті манози, або їх похідні або попередники в клітині. Агент, який може знизити токсичність сполуки в клітинах, як правило, є похідним глюкози, таким як метил-3-О-глюкоза або флоридзин. При їх застосуванні трансформовані клітини виявляють, не пошкоджуючи або знищуючи при цьому нетрансформовані клітини в популяції, і без одночасної інтродукції генів, які зумовлюють стійкість до антибіотиків або гербіцидів. Як описано в WO 93/05163, крім того, що усувається необхідність у генах, які зумовлюють стійкість до антибіотиків або гербіцидів, було встановлено, що метод позитивного відбору часто є істотно більш ефективним, ніж традиційний метод негативного відбору.

Таким чином, промотори за даним винаходом переважно функціонально зв'язують з нуклеотидною послідовністю, яка кодує протеїн, що включає ділянку, яка: (а) кодує протеїн, який бере участь у метаболізмі сполуки, і/або (б) регулює активність

гена, що кодує протеїн, де сполука представляє собою манозу або ксилозу або їх похідне або попередник або субстрат протеїну, або вона в результаті метаболізму трансформованими клітинами може перетворюватися в такий субстрат. Вказана нуклеотидна послідовність може кодувати манозо-6-фосфат-ізомеразу і сполука може представляти собою манозу. В іншому варіанті нуклеотидна послідовність кодує фосфосахароізомеразу, фосфосахаромутазу, таку як фосфоманомутаза, фосфатазу, таку як манозо-6-фосфатаза, сахаро-епімеразу, сахаропермеазу, фосфосахаропермеазу або ксилозо-ізомеразу, а сполука може представляти собою манозу, манозо-6-фосфат, D-манозеамін або ксилозу.

Відповідно до переважного варіанту здійснення винаходу промотори за винаходом функціонально зв'язують з кодувальною ділянкою ген *mapA* *E. coli* (Joersbo і Okkels, *Plant Cell Reports*, 16: 219-221 (1996), Negrotto і ін. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803 (2000)), що кодує фосфоманозо-ізомеразу (PMI), і термінатором *Nos* (нопалін-синтетаза), отриманим з Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker і ін., *J. Mol. Appl. Gener.*, 1 (6), 561-573 (1982)). Фахівцю в даній галузі відомо, що термінатор *Nos* можна замінювати будь-яким іншим термінатором, який функціонує в рослинах. Промотор за винаходом може представляти собою *CmpD*, *CmpC*, *CmpS*, *Cmp1*, *CmpB*, *CmpA*, *CmpE* або *CmpF*, які представлені в SEQ ID NO:1-6 і 19-20, або будь-який інший виведений з них промотор. Відповідно до ще більш переважного варіанту здійснення промотор представляє собою промотор *CmpS*, наведений у SEQ ID NO:3.

Промотори за даним винаходом можна застосовувати для надання стійкості або толерантності до вірусів шляхом функціонального зв'язування промоторів за винаходом з кодувальними ділянками генів вірусів, що підлягають знищенню.

Для боротьби з вірусами можна використовувати негативний ланцюг вірусів, таких як вірус плямистого в'янення томатів (TSWV), послідовності генів вірусного нуклеокапсидного протеїну (NP), протеїну, який забезпечує рух вірусу (MP), а для вірусів, які належать до альфа-подібної супергрупи вірусів, таких як TMV (вірус тютюнової мозаїки) і CMV (вірус огіркової мозаїки), можна застосовувати послідовності генів РНК-залежної РНК-полімерази (РзРп) і гена протеїну, який забезпечує рух вірусу (MP). Для вірусів, які належать до Рісона-подібної супергрупи вірусів, включаючи потівіруси, будь-яку послідовність вірусу можна зв'язувати з промоторами за винаходом. Нарешті, для всіх інших вірусів, включаючи ДНКові віруси, можна застосовувати послідовності генів РНК-залежної РНК-полімерази (РзРп) або зв'язані з репліказою послідовності генів. Приклади таких конструкцій, призначених для боротьби з вірусами, наведені в прикладі 8 і прикладі 9 WO 00/68374. Фахівцю в даній галузі повинно бути очевидно, як замінювати промотори, описані в WO 00/68374, на промотори за даним винаходом. На основі відомостей, наведених у WO 00/68374, фахівцю в даній галузі також повинно бути ясно, як створювати конструкції, які включають промотори за винаходом, функціонально зв'язані з вказаними вище

вірусними послідовностями з метою надання стійкості або толерантності до цих вірусів.

Замість експресії в трансгенних рослинах дволанцюгової вірусної РНК, що описано в WO 00/68374, вірусну РНК можна також експресувати у вигляді конструкції: нетрансльована РНК плюс молекула смислової вірусної РНК, як це описано, наприклад, у патенті США 558302 або в прикладах 12 і 13 даного опису.

Ще одним об'єктом винаходу є рекомбінантні експресійні вектори, які містять послідовність ДНК за винаходом, зливу зі зв'язаною з нею послідовністю, що представляє інтерес. У цих векторах чужорідну ДНК можна вбудовувати в ділянку полілінкера таким чином, щоб ці екзогенні послідовності можна було експресувати у прийнятній клітині-хазяїні, яка наприклад, може мати бактеріальне або рослинне походження. Наприклад, плазмід рВ1101, виведена з бінарного вектора *Agrobacterium tumefaciens* рВ1N19, дозволяє клонувати і тестувати промотори за допомогою сигналу експресії бета-глюкуронідази (GUS) (Jefferson і ін., EMBO J., і ін., 6: 3901-3907 (1987)). Розмір вектора складає 12,2 т.п.н. Він включає сайт ініціації реплікації плазмід з малою кількістю копій RK2 і зумовлює стійкість до канаміцину як у бактерій, так і в рослин. Фахівцю в даній галузі відомі численні інші експресійні вектори, які можна застосовувати відповідно до винаходу.

Ще одним об'єктом даного винаходу є трансгенні рослини, які містять рекомбінантні послідовності ДНК за винаходом. Винахід стосується також рослинних клітин, рослин, отриманих з таких клітин, рослинного матеріалу, потомства і насіння, отриманого від таких рослин, і сільськогосподарських продуктів, що відрізняються поліпшеними властивостями, які одержують за допомогою будь-якого з описаних нижче методів трансформації. Рослини, трансформовані відповідно до винаходу, можуть представляти собою однодольні або дводольні рослини і включають (але не обмежуючись ними) рис, кукурудзу, пшеницю, ячмінь, жито, соловодку картоплю, цукрову кукурудзу, боби, горох, цикорій, салат, капусту, цвітну капусту, брокколі, турнепс, редис, шпинат, спаржу, цибулю, часник, перець, селеру, гарбуз великоплідний, гарбуз пепло, коноплі, цукіні, яблуню, грушу, айву, диню, сливу, вишню, персик, нектарин, абрикос, суніцю, виноград, малину, ожину, ананас, авокадо, папайю, манго, банан, сою, томати, сорго, цукровий очерет, цукровий буряк, соняшник, рапс, конюшину, тютюн, моркву, бавовник, люцерну, картоплю, баклажан, огірок, *Arabidopsis thaliana* і деревні рослини, такі як хвойні і листяні дерева. Переважними рослинами, що підлягають трансформації, є рис, кукурудза, пшениця, ячмінь, капуста, цвітна капуста, перець, гарбуз великоплідний, диня, соя, томати, цукровий буряк, соняшник або бавовник, і особливо переважно рис, кукурудза, пшениця, *Sorghum bicolor*, їжа збірна, цукрова буряк і соя. Рекомбінантні послідовності ДНК за винаходом можна інтродукувати у рослинну клітину численними відомими в даній галузі шляхами. Фахівцям у даній галузі повинно бути очевидно, що вибір методу повинний залежати від типу рослини, яка підлягає трансформації, (тобто однодольної або дво-

дольної). Придатні методи трансформації рослинних клітин включають мікроін'єкцію (Crossway і ін., BioTechniques 4: 320-334 (1986)), електропорацію (Riggs і ін., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83:5602-5606 (1986)), опосередковувану *Agrobacterium* трансформацію (Hinchee і ін., Biotechnology 6: 915-921 (1988); EP 0853675), безпосереднє перенесення гена (Paszkowski і ін., EMBO J. 3: 2717-2722 (1984)), і метод балістичного прискорення частинок з використанням пристроїв, які випускаються фірмами Agracetus, Inc., Медісон, штат Вісконсін і Dupont, Inc., Вілмінгтон, штат Делавар (див., наприклад, патент США 4945050; і McCabe і ін., Biotechnology 6: 923-926 (1988)). Клітини, що підлягають трансформації, можуть представляти собою диференційовані клітини листків, ембріогенні клітини або будь-які інші типи клітин. При безпосередній трансформації протопластів поглинання екзогенного генетичного матеріалу в протопласт можна збільшити за допомогою хімічного агента або електричного поля. Екзогенний матеріал потім може інтегруватися в ядерний геном. У попередніх дослідженнях використовували дводольну рослину - тютюн, для цих рослин встановлено, що чужорідна ДНК включається в геном і переноситься в потомство рослин (Paszkowski і ін., EMBO J. 3:2712-2722 (1984); Potrykus і ін., Mol. Gen. Genet 199:169-177 (1985)). За допомогою цієї процедури можна трансформувати протопласти таких однодольних рослин, наприклад, як *Triticum monosocum*, *Lolium multiflorum* (італійське жито), кукурудза і чорна мексиканська цукрова кукурудза. Ще одним переважним варіантом є спосіб трансформації кукурудзи, описаний у EP 0292435, а також у EP 0846771. Методи трансформації кукурудзи описані також у Koziel і ін., Bio/Technology 11:194-200 (1993). Трансформацію рису можна здійснювати за допомогою методів прямого перенесення генів з використанням протопластів або бомбардування частинками. Опосередковувана протопластом трансформація описана для японських і індійських типів рису (Zhang і ін., Plant Cell Rep., 7:379-384 (1988); Shimamoto і ін., Nature 338:274-276 (1989); Datta і ін., Bio/Technology 8:736-740 (1990)). Обидва вказані вище типу рису, як правило, можна трансформувати бомбардуванням частинками (Christou і ін., Bio/Technology 9:957-962 (1991)). У EP 033281 описані методи одержання, трансформації і регенерації протопластів *Pooideae*. За допомогою цих методів можна трансформувати всіх представників *Pooideae*, включаючи *Dactylis* і пшеницю. Методи трансформації пшениці описані також у EP 0674715; і в Weeks і ін., (Plant Physiol. 102:1077-1084 (1993)). Сконструйовані в такий спосіб рослинні експресійні вектори можна застосовувати, наприклад, для трансформації за допомогою загальноприйнятих методів калюсів рису і тим самим індукувати диференціацію коренів і листя і після цього переносити в квіткові горщики, одержуючи трансформовані рослини рису.

У рослинах, отриманих у результаті трансформації за допомогою послідовностей ДНК або векторів за даним винаходом, експресія нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес, повинна відбуватися у всій рослині й у більшості її тканин і

органів.

Генетичні особливості, сконструйовані в описаних вище трансгенних рослинах, передаються за допомогою статевого розмноження або вегетативного росту і, таким чином, можуть зберігатися і успадковуватися потомством рослин. Звичайно вказане зберігання і передачу потомству здійснюють з використанням відомих сільськогосподарських методів, розроблених для конкретних цілей, таких як обробка ґрунту, сімба або збирання врожаю. Також можна застосовувати спеціалізовані методи, такі як гідропоніка або вирощування в закритому ґрунті. Крім того, генетичні особливості трансгенних рослин за винаходом, що дають переваги, можна використовувати при селекції рослин з метою виведення рослин з поліпшеними властивостями, такими як толерантність до шкідників, гербіцидів або стресу, з поліпшеною поживною цінністю, підвищеною врожайністю або поліпшеною будовою, що сприяє зменшенню втрат від вилягання або опадання. Для різних стадій селекції характерно цілеспрямоване втручання людини, таке як відбір ліній, які підлягають схрещуванню, безпосереднє запилення батьківських ліній або відбір відповідного потомства рослин. Залежно від потрібних властивостей вибирають різні методи селекції. Відповідні методи добре відомі в даній галузі і включають (але не обмежуючись ними) гібридизацію, інбридинг, поворотне схрещування, багатолінійне схрещування, змішування сортів, міжвидову гібридизацію, методи анеуплоїдії і т.д. Методи гібридизації також включають стерилізацію рослин з метою одержання чоловічих жіночих або стерильних рослин за допомогою механічних, хімічних або біохімічних способів. Перехресне запилення чоловічої стерильної рослини пилом різних ліній гарантує, що геном чоловічої стерильної, але фертильної жіночої рослини буде так само набувати властивості обох батьківських ліній. Таким чином, трансгенні рослини за даним винаходом можна застосовувати для селекції поліпшених ліній рослин, що, наприклад, дозволяє збільшити ефективність звичайних методів, таких як обробка гербіцидом або пестицидом, або дає можливість обійтися без цих методів завдяки модифікованим генетичним особливостям цих рослин. Крім того, можна одержувати нові культурні рослини з поліпшеною толерантністю до стресу завдяки оптимізації генетичного "апарата", що дозволяє одержувати врожай продуктів кращої якості в порівнянні з продуктами, отриманими від рослин, які не мають здатність опиратися аналогічним шкідливим умовам у процесі їх розвитку.

І ще одним об'єктом даного винаходу є послідовності ДНК, які можна застосовувати для експресії нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес, у необхідному організмі. Цей організм може представляти собою бактерію, рослину або будь-який інший організм, що представляє інтерес.

Крім того, опис SEQ ID NO:1-6 дає можливість фахівцям у даній галузі створювати олігонуклеотиди для полімеразних ланцюгових реакцій, які можуть забезпечувати ампліфікацію фрагментів ДНК при використанні як матриці послідовності нуклеотидів, що характеризується наявністю будь-якої з безперервних послідовностей, що включа-

ють 15 і переважно 20-30 або більше пар основ SEQ ID No:1, 2, 3, 4, 5 або 6. Такі нуклеотиди представляють собою послідовність нуклеотидів, яка складається з 15 і переважно 20-30 або більше пар основ SEQ ID No:1, 2, 3, 4, 5 або 6. Полімеразні ланцюгові реакції здійснюють з використанням принаймні одного такого олігонуклеотиду, отриманий у результаті продукту ампліфікації є ще одним об'єктом даного винаходу.

Короткий опис послідовностей. Наведених у переліку послідовностей

SEQ ID NO:1 CmpD
 SEQ ID NO:2 CmpC
 SEQ ID NO:3 CmpS
 SEQ ID NO:4 Cmp1
 SEQ ID NO:5 СтрВ
 SEQ ID NO:6 СтрА
 SEQ ID NO:7 прямий праймер S1
 SEQ ID NO:8 зворотний праймер S2
 SEQ ID NO:9 прямий праймер GUS
 SEQ ID NO:10 зворотний праймер GUS
 SEQ ID NO:11 прямий праймер CAT
 SEQ ID NO:12 зворотний праймер CAT
 SEQ ID NO:13 прямий праймер Cmp1
 SEQ ID NO:14 зворотний праймер CmpC2
 SEQ ID NO:15 зворотний праймер CmpS2
 SEQ ID NO:16 зворотний праймер Cmp12
 SEQ ID NO:17 прямий праймер PA
 SEQ ID NO:18 зворотний праймер PA
 SEQ ID NO:19 CmpE
 SEQ ID NO:20 CmpF
 SEQ ID NO:21 прямий праймер термінатора NOS
 SEQ ID NO:22 зворотний праймер термінатора NOS
 SEQ ID NO:23 прямий праймер гена NP TSWV
 SEQ ID NO:24 зворотний праймер гена NP TSWV
 SEQ ID NO:25 прямий праймер промотору CmYLCV
 SEQ ID NO:26 зворотний праймер промотору CmYLCV
 SEQ ID NO:27 сайт множинного клонування AGLINK
 SEQ ID NO:28 сайт множинного клонування BIGLINK
 SEQ ID NO:29 праймер Cmpf-B
 SEQ ID NO:30 праймер CmpS-B SEQ ID NO:31
 SEQ ID NO:31 pNOV2804; бінарний вектор, що містить позбавлену промотору касету експресії PMI-термінатор nos
 SEQ ID NO:32 pNOV3604; вектор для біобалістичної трансформації, що містить позбавлену промотору касету експресії PMI-термінатор nos
 SEQ ID NO:33 зворотний праймер CmpMr
 SEQ ID NO:34 прямий праймер CmpMf
 SEQ ID NO:35 зворотний праймер CmpMrs
 SEQ ID NO:36 прямий праймер CmpMfs
 SEQ ID NO:37 synGFPI; оптимізований для застосування в рослинах ген GFP з інтроном
 SEQ ID NO:38 GIG; ген GUS з інтроном
 SEQ ID NO:39 зворотний праймер Cmp-C
 SEQ ID NO:40 касета експресії CmpS-synGFPI-nos
 SEQ ID NO:41 касета експресії CmpS-GIG-nos
 SEQ ID NO:42 касета експресії CmpC-synGFPI-nos
 SEQ ID NO:43 касета експресії CmpC-GIG-nos

SEQ ID NO:44 вектор pNOV2117
 SEQ ID NO:45 вектор pNOV4200
 SEQ ID NO:46 касета експресії ZmUbi-GFP-35S term
 SEQ ID NO:47 касета експресії ZmUbi-GIG-nos
 SEQ ID NO:48 касета експресії Ubq3(At)-synGFPI-nos
 SEQ ID NO:49 касета експресії Ubq3(At)-GIG-nos

ПРИКЛАДИ

У даному описі застосовували стандартні методи рекомбінантної ДНК і молекулярного клонування, добре відомі в даній галузі і викладені, наприклад, у Sambrook і ін. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989 і в Ausubel і ін. "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, New York, 1994.

Приклад 1: Клонування вірусів

1. Екстракція ДНК

Вірусну геномну ДНК екстрагують із заражених вірусом жовтого скручування листя цестрових рослин *Cestrum parqui*. П'ять грамів заражених листків гомогенізують у 30мл буферу для подрібнення (0,2М Трис, рН 7,0, 0,02М ЕДТК, 2М сечовина) протягом 60с при максимальній швидкості в гомогенізаторі типу Brinkman Polytron з використанням як зонда РТІО і обережно стррушують при 4°C протягом ночі в присутності Triton X-100 (кінцева концентрація 2%). Вірус виділяють з неочищеного гомогенату за допомогою центрифугування при низькій швидкості обертання (10000об/хв протягом 20хв у роторі типу Sorvall SS-34), і далі з отриманого супернатанту за допомогою центрифугування при високій швидкості обертання (27000об/хв протягом 2 год у роторі типу Beckman SW-28) у градієнті сахарози (3мл 15%-ної сахарози). Потім дебріс, який містить вірус, ресуспендують у 0,1М Трис, рН 7,4, 2,5мМ MgCl₂. Додають ДНКазу I (фірма Sigma) і РНКазу А (фірма Sigma) до концентрації 10мг/мл кожної. Після інкубації протягом 30хв при 37°C реакцію припиняють, додаючи ЕДТК до концентрації 10мМ. Вірусну ДНК виділяють з частинок, що містять CmYLCV, за допомогою обробки протеазою К (фірма E. Merck, кінцева концентрація 0,5мг/мл) у присутності 1%) ДСН при 65°C протягом 15хв. Потім вірусну ДНК очищають екстракцією фенолом і осадженням етанолом. Вірусну ДНК, яка міститься в кінцевому осаді, отриману шляхом осадження етанолом, розчиняють у воді.

2. Ампліфікація і клонування ДНК

100нг отриманої ДНК використовують як матрицю для ПЛР-ампліфікації в 50мкл реакційної суміші, що містить по 10мкМ кожного праймера, 25мМ кожного дНТФ, 5мкл реакційного буфера Pfu (фірма Stratagene) і 2,5 од. ДНК-полімерази Pfu turbo (фірма Stratagene). Для ПЛР використовують прямий праймер S1 (gaccacaacatcagaag, SEQ ID NO:7) і зворотний праймер S2 (caaacatttggttaac, SEQ ID NO:8). ПЛР здійснюють з використанням наступних циклів: 1х (94°C протягом 1хв); 30х (94°C протягом 1хв, 50°C протягом 1хв, 72°C протягом 1хв); 1х (72°C протягом 10хв). Кожен окремих фрагмент ДНК клонують у плазміді pPCR-Script™ Amp SK(+) (фірма Stratagene) відповідно до інструкцій виробника.

Приклад 2: Секвенування ДНК

Секвенування ДНК вірусних клонів здійснюють за допомогою автоматичного секвенатора ДНК типу ABI PRISM 377 (фірма Perkin Elmer) і набору для циклічного секвенування термінатора типу ABI PRISM dRhodamine (фірма Perkin Elmer) відповідно до інструкцій виробника. Для реакцій секвенування використовують описані вище праймер S1 і праймер S2 (приклад 1), а також універсальний праймер M13-20 і зворотні праймери.

Приклад 3: Конструювання плазмід для короткочасної експресії

Усі ПЛР здійснюють з використанням полімерази Pfu (фірма Stratagene), відповідно до методу, описаному в прикладі 1.

1. Ампліфікація репортерних генів

Ампліфікують репортерні гени бета-глюкуронідази (GUS) і хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT). Для ампліфікації гена GUS використовують прямий олігонуклеотидний GUS-праймер (cagggtaccactaaatcacc, SEQ ID NO:9) і зворотний олігонуклеотидний GUS-праймер (aggggatccccaattcccc, SEQ ID NO:10) при температурі відпалювання 60°C. Прямий олігонуклеотидний CAT-праймер (aggggtaccatcgatgtggag, SEQ ID NO:11) і зворотний олігонуклеотидний CAT-праймер (ttaggatccgcctgtccac, SEQ ID NO:12) відпалюють при 62°C. Прямі праймери створюють так, щоб вони включали сайт, що розпізнається KpnI, а зворотні - сайт, що розпізнається BamHI.

2. Ампліфікація промотору CmYLCV

Для дослідження вибирають три різних промоторних фрагменти, тобто CmpC (SEQ ID NO:2), CmpS (SEQ ID NO:3) і Cmp1 (SEQ ID NO:4). Прямий праймер Cmp1 (cttctagacaaagtggcagac, SEQ ID NO:13) використовують у всіх трьох випадках для ампліфікації при температурі відпалювання 52°C. Він відрізняється (виділено жирним шрифтом) від вихідної послідовності наявністю сайту, що розпізнається XbaI. Зворотний праймер CmpC2 (ttgtacctaacaatgaggg, SEQ ID NO:14) застосовують для ампліфікації CmpC-фрагмента, а зворотний праймер CmpS2 (ctactctaggtacctgtctc, SEQ ID NO:15) застосовують для ампліфікації CmpS-фрагмента. Обидва ці праймери модифіковані і відрізняються наявністю сайту, що розпізнається KpnI. Зворотний праймер Cmp12 (ttgtacctaacaatgaggg, SEQ ID NO:16) використовують для ампліфікації Cmp1-фрагмента, і він модифікований і відрізняється наявністю сайту рестрикції ClaI.

3. Ампліфікація сигналу поліаденілування

Фрагменти сигналу поліаденілування ампліфікують із клону, зараженого вірусом мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Franck і ін., Cell 21 (1), 285-294 (1980)). Для ПЛР-ампліфікації використовують прямий олігонуклеотидний праймер PA (polyadenylation signal amplification-ампліфікація сигналу поліаденілування) (ggggatccccagctctctc, SEQ ID NO:17) і зворотний олігонуклеотидний праймер PA (gtgaattcgagctcgga, SEQ ID NO:18), і відпалювання здійснюють при температурі 60°C. Прямий праймер створюють так, щоб він включав сайт, що розпізнається BamHI, а зворотний - сайт EcoRI.

4. Отримані конструкції

pCmpCG (промоторний фрагмент CmpC + ген

GUS + poly A)

pCmpSG (промоторний фрагмент CmpS + ген GUS + poly A)

pCmpCC (промоторний фрагмент CmpC + ген CAT + poly A)

pCmpSC (промоторний фрагмент CmpS + ген CAT + poly A)

pCmp1C (промоторний фрагмент CmpT + ген CAT + poly A)

Касети, які містять промоторний фрагмент, репортерні гени і сигнал поліаденілування, вбудовують у вектор pUC19 (фірма Stratagene), розщеплений за допомогою XbaI і EcoRI.

5. Конструкції, які застосовують для порівняльного аналізу

pCapG (промоторний фрагмент Cap + ген GUS + polyA)

pCapSG (промоторний фрагмент CapS + ген GUS + polyA)

pCapC (промоторний фрагмент Cap + ген CAT + poly A)

Промоторні фрагменти, що містять ці конструкції, одержують з CaMV (Franck і ін., Cell 21 (1), 285-294 (1980), див. реєстраційний номер GenBank V00141). Фрагменти GUS, CAT і polyA ідентичні до фрагментів, які застосовують для CmYLCV-конструкцій. Cap відповідає фрагменту, що розташований від основи -227 до основи + 33 TATA-боксу (основи 7175-7438 геному CaMV, див. реєстраційний номер GenBank V00141), а CapS відповідає фрагменту, що розташований від основи -227 до основи + 82 TATA-боксу (основи 7175-7486 геному CaMV, див. реєстраційний номер GenBank V00141). Ці положення приблизно відповідають положенням, вибраним для CmYLCV-фрагментів.

Приклад 4: Експерименти із короточасної експресії

1. Одержання суспензійних культур і протопластів *Orychophragmus violaceus*.

Суспензійні культури підтримують у 40мл MS-середовища (Murashige і Skoog, Physiol Plant 15, 474-497 (1962)), яке включає 100мг/мл інозиту, 2% сахарози і 0,1мг/мл 2,4-Д. Протопласти виділяють з 4-5-денних культур. Клітинні стінки розщеплюють, витримуючи при 26°C протягом 1 год у суміші, яка містить 0,1% пектоліази Y23 (фірма Seishin Pharmaceutical Co., Японія), 1%> целюлази Onozuka RIO (фірма Yakult Honsha Co., Японія), 0,4М D-маніт і 0,1% MES, pH 5,5. Протопласти фільтрують через сито з розміром пор 50мкм і двічі промивають розчином для електропорації (ЕП) (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 5мМ CaCl₂, 0,2М маніт, pH 7,1).

Nicotiana plumbaginifolia.

Рослини підтримують в асептичних умовах у середовищі RPM2 (Blonstein і ін., Mol Gen Genet 211, 252-259 (1988)), доповненим 7г/л бакто-агару, pH 5,6. Для одержання протопластів відрізають листя і інкубують протягом ночі при 26°C у розчині, який містить 0,5% дризелази (фірма Fluka), 0,25мМ ПВП 10 (полівінілпіролідон MM 10000), 3,85мМ CaCl₂, 6мг/л НОК (нафталіноцтова кислота), 2мг/л ВАР (лужна фосфатаза бактерій) і 0,5М сахарозу, pH 5,7. Протопласти фільтрують через сито з розміром пор 100мкм. Для здійснення пер-

шої стадії очищення до протопластів додають розчин сахарози (0,6М сахароза, 0,1% MES і 15мМ CaCl₂, pH 5,7) і суспензію доповнюють W5-розчином (150мМ NaCl, 125мМ CaCl₂, 5мМ KCl, 6мМ глюкоза; Menczel і ін., Theor Appl Genet 59, 191-195 (1981)). Потім протопласти однократно промивають W5-розчином і, нарешті, ЕП-розчином.

Oryza sativa.

Протопласти одержують із суспензійної культури морфогенетичного рису, створеної з *O. sativa* cv. Nipponbare відповідно до відомого методу (Datta і ін., Bio/Technology 8:736-740 (1990)).

2. Експеримент із короточасної експресії

Трансфекцію за допомогою електропорації 2x10⁶ протопластів *Orychophragmus violaceus* у 0,66мл ЕП-буфера здійснюють шляхом розряду конденсатора ємністю 960мкФ через шар суспензії протопластів товщиною 4мм. Конденсатор заряджають при напрузі 450В. Електропорацію здійснюють у присутності 5-10мкг плазмідної ДНК, потім протопласти культивують протягом 16-24год при 25°C. Трансфекцію 2x10⁶ протопластів *Nicotiana plumbaginifolia* у 0,3мл суспензії здійснюють у присутності 0,3мл ПЕГ (40% поліетиленгліколь 6000) і 5-10мкг плазмідної ДНК. Протопласти культивують у 0,4мл К3-середовища (Godall і ін., Methods Enzymol 181, 148-161 (1990)) протягом 16-24 год при 25°C і доповнюють 10мл WS-буфера перед збиранням. Протеїнові екстракти одержують за допомогою принаймні трьох циклів заморожування і відтавання й освітлюють центрифугуванням.

Приклад 5: Аналізи CAT і GUS

Для виявлення експресії гена CAT використовують подвійний імуносендвіч (DAS)-ELISA і набір CAT ELISA (фірма Boehringer) відповідно до інструкцій виробника. Активність CAT оцінюють за допомогою пристрою типу Dynex MRXII. Для здійснення аналізу активності GUS зразки розчиняють у GUS-буфері (0,05М NaPO₄, pH 7, 0,01М ЕДТК, 0,1% Triton-X-100, 0,1% саркозилу). Реакцію здійснюють у присутності однакової кількості реакційного GUS-буфера (100мл/л 10x GUS-буфера, 200мг/л BCA, 705мг/л 4-метилумбеліферилглюкуроніду) при 37°C і припиняють, додаючи 2М амедіол. Для оцінки активності використовують пристрій типу Titertek Fluoroskan II.

Результати оцінки активності CAT і GUS нормалізують по відношенню до відповідного значення для стандартного клону. Результати, отримані в 10 різних експериментах, свідчать про те, що різні промоторні фрагменти CmYLCV мають високу промоторну активність.

Короточасна експресія в протопластах *N. plumbaginifolia*

Репортерний ген GUS

CmpCG	100
CmpSG	86,9 +/-20%
CapG	9 +/-20%
CapSG	38,9 +/-15%

Репортерний ген CAT

CmpCC	100
-------	-----

CmpSC	78 +/-20%
CapSC	89,5 +/-15%
Cmp1C	9 +/-20%

Короткочасна експресія в протопластах *O. violaceus*

Репортерний ген GUS

CmpCG	100
CmpSG	84,6 +/-15%
CapG	9,6 +/-15%
CapSG	40,7 +/-15%

Репортерний ген CAT

CmpCC	100
CmpSC	255 +/-20%
CapSC	546 +/-15%
Cmp1C	10 +/-20%

Короткочасна експресія в протопластах *O. sativa*

Репортерний ген GUS

CmpCG	100
CmpSG	84,6 +/-15%
CapG	9,6 +/-15%
CapSG	40,7 +/-15%

Приклад 6: Приготування розчинів і середовищ для регенерації і трансформації рослин

Культуральні середовища GM, CIM і SIM представляють собою середовища, описані в Valvekens і ін. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5536-5540 (1988)). Культуральне середовище GM містить мінеральні солі Мурасиги і Скуга (Murashige і Skoog, Physiol. Plant. 15:473-497 (1962)), 1,0мг/л тіаміну (маточний розчин, 1мг/мл), 0,5мг/л піридоксин-HCl (маточний розчин, 1мг/мл), 0,5мг/л нікотинової кислоти (маточний розчин, 1мг/мл), 0,5г/л 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти (MES), 10г/л сахарози, 8г/л агару, значення pH доводять до 5,8 за допомогою 1н. КОН. Середовище CIM містить мінеральні солі і вітаміни B5-середовища (Gamborg і ін., Exp. Cell Res. 50:151-158 (1968)), 0,5г/л 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти (MES), 20г/л глюкози, 0,5мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) (маточний розчин, 10мг/мл у ДМСО), 0,05мг/л кінетину (маточний розчин, 5мг/мл у ДМСО), pH 5,8. Тверде CIM-середовище містить 8г/л агару. Середовище SIM містить мінеральні солі і вітаміни B5-середовища (Gamborg і ін., вище), 0,5г/л 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти (MES), 20г/л глюкози, 5мг/л N6-(2-ізопентенил)аденіну (2iP) (маточний розчин, 20мг/мл у ДМСО), 0,15мг/л індол-3-оцтової кислоти (IOK) (маточний розчин, 1,5мг/мл у ДМСО), 8г/л агару, pH 5,8. Середовище SIM V750 K100 представляє собою SIM-середовище, доповнене 750мг/л ванкоміцину і 100мг/л канаміцину. Середовище SIM Y500 K100 представляє собою SIM-середовище, доповнене 500мг/л ванкоміцину і 100мг/л канаміцину. Середовище GM K50 представляє собою GM-середовище, доповнене 50мг/л канаміцину.

Усі культуральні середовища стерилізують автоклавуванням (20хв, 121°C). Вітаміни розчиняють у воді і додають до середовищ перед автоклаву-

ванням. Гормони розчиняють у диметилсульфоксиді (ДМСО). Антибіотики розчиняють у воді і стерилізують фільтрацією (0,22мкм). Гормони й антибіотики додають після автоклавування й охолодження середовищ до 65°C. В усіх випадках використовують 9-сантиметрові чашки Петрі (фірма Falcon, 3003) за винятком середовищ GM і GM K50, які, як правило, розливають у 15-сантиметрові чашки Петрі (фірма Falcon, 3025).

Пластили з твердими середовищами сушать перед застосуванням у ламінарному потоці для видалення конденсату.

Приклад 7: Штам *Arabidopsis* і умови його вирощування

Насіння *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia (Col-0) дикого типу одержують від фірми Lehle Seeds, США (1102 South Industrial Blvd. Suite D, Round Rock TX 78681, США). Рослини вирощують при 22°C при світловому циклі 16 год світла/8 год темряви в квіткових горщиках у суміші, що містить 4 частини піску, 4 частини садового ґрунту і 1 частину агриліту.

Приклад 8: Штам і культура *Agrobacterium*

Векторні плазмиди інтродукують у реципієнтний штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (фірма Clontech) шляхом трибатьківського схрещування відповідно до протоколу, описаному в Walkerpeach і Velten ("Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: Cointegrate and binary vector systems", in: Plant Molecular Biology Manual, B1: 1-19, 1994, ред-ри: S.B. Gelvin, R.A., Schilperoort, Kluvers Acad. Publishers.). Як мобілізуючий штам використовують штам *E. coli* HB101, який несе кон'юговану плазмиду pRK2013 (Ditta і ін. Broad host range DNA cloning system from Gram-negative bacteria. Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351 (1980)). Застосовувані для трансформації кореня агробактерії вирощують у LB-середовищі (Sambrook і ін., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989) без антибіотиків при 28°C і 200об/хв.

Приклад 9: Стерилізація насіння

Насіння поміщають у суміш 70% EtOH/0,05% Tween 20 на 1хв у пробірці Еппендорфа об'ємом 2мл. Суміш 70% EtOH/0,05% Tween 20 видаляють за допомогою піпетки і замінюють сумішшю 5% NaOCl/0,05% Tween 20, у якій насіння витримують 15хв. Насіння регулярно струшують. Розчин видаляють у стерильних умовах і насіння промивають стерильною дистильованою водою тричі кожного разу по 10хв. Після останнього промивання насіння витримують у 0,5-1мл води. Насіння можна використовувати негайно або зберігати при 4°C протягом 2-3 тижнів. Стерилізовані насіння (20-30 штук) переносять пінцетом на GM-середовище в 15-сантиметрові чашки Петрі. Проростки вирощують у вертикальному положенні в планшетах у вегетаційній камері (22°C; світловий цикл 16 год світла/8 год темряви).

Приклад 10: Трансформація експлантатів кореня *Arabidopsis thaliana*

Для трансформації використовують корені тритижневих проростків. Корені не повинні бути ні зеленими, ні коричневими. Зелені частини проростків видаляють за допомогою скальпеля і пінцета.

Відбирають корені, що залишилися, і приблизно по 5 повних кореневих систем поміщають на планшет із твердим СІМ-середовищем. Корені обережно притискають до поверхні планшета для того, щоб забезпечити повний контакт із середовищем, однак вони не повинні бути занурені в агар. Корені інкубують протягом трьох днів у вегетаційній камері (22°C; світловий цикл 16 світла/8 год темряви). Потім корені переносять у стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером, змоченим рідким СІМ-середовищем, і розрізають скальпелем на шматочки довжиною 0,5-1 см. Після цього експлантати кореня переносять у стерильну пробірку Фалкона об'ємом 50 мл, що містить 10 мл рідкого СІМ-середовища. У нього додають 0,5 мл культури *Agrobacterium*, вирощеної протягом ночі (оптична густина ОГ 0,6-1) і інкубують протягом 1-2 хв при обережному струшуванні. Рідину зливають із пробірки через стерильні металеві сита (розмір комірок 50 меш, фірма Sigma, сита типу S-0895), які утримують за допомогою пінцета. Корені звичайно залишаються на стінці пробірки поблизу її краю. Потім експлантати кореня переносять у стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером і швидко промокають для видалення надлишку рідини. Експлантати кореня поміщають на планшети з твердим СІМ-середовищем і інкубують у вегетаційній камері протягом 2 днів при слабкому освітленні (1,5-2 клк). Після періоду спільного культивування можна спостерігати невеликі прояви розростання *Agrobacterium*. Потім експлантати кореня переносять у стерильну пробірку Фалкона об'ємом 50 мл, що містить 20 мл рідкого СІМ-середовища, доповненого 1000 мг/л ванкомицину. Після цього пробірку Фалкона обережно струшують для видалення *Agrobacteria*. Рідину зливають із пробірки як описано вище і експлантати швидко промокають за допомогою фільтрувального паперу. Потім експлантати переносять на планшети, які містять середовище SIM V750 K100. Корені повинні знаходитися в щільному контакті із середовищем. Експлантати інкубують у вегетаційній камері в стандартних умовах протягом одного тижня і потім переносять у середовище SIM V750 K100 і інкубують протягом ще одного тижня. Після цього концентрацію ванкомицину зменшують до 250 мг/л. Появу перших проростків слід очікувати наприкінці третього тижня культивування на SIM-середовищі. Проростки вирізують після того, як вони досягають розміру 0,3-0,5 см, видаляють весь калюс, що залишився, і проростки переносять на 15-сантиметрові планшети, які містять середовище GM K50. На один планшет поміщають максимум 3 проростки. Для одержання більшої кількості проростків можна переносити експлантати, що залишилися, ще на два тижні; на планшети зі свіжим SIM-середовищем, доповненим 125 мг/л ванкомицину і 100 мг/л канаміцину. Проростки, які мають корені, можна переносити в ґрунт із метою одержання насіння. Проростки, які не мають коренів, переносять у контейнери типу Magenta (по одному на контейнер), що містять GM-середовище, для одержання насіння *in vitro*.

Насіння окремих трансгенних рослин пророщують на середовищі GM K50 у вегетаційній камері протягом 2 тижнів. Для подальшого аналізу від-

бирають стійкі до канаміцину проростки з нормальним фенотипом, що мають зелені справжні листки і розгалужену кореневу систему.

Приклад 11: Гістохімічний аналіз β -глюкуронідази (GUS)

Для аналізів GUS застосовують вирощені *in vitro* проростки або рослини, вирощені в ґрунті. Цілі проростки або розрізані на частині органи занурюють у розчин для фарбування GUS. Розчин для фарбування GUS містить 1 мМ 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкуронід (X-Gluc, фірма Duchefa, 20 мМ маточний розчин у DMSO), 100 мМ Na-фосфатний буфер, pH 7,0, 10 мМ ЕДТК, pH 8,0, і 0,1% Triton X100. Зразки тканини інкубують при 37°C протягом 1-16 год. При необхідності зразки можна очищати шляхом декількох промивань з використанням 70% EtOH для видалення хлорофілу.

Приклад 12: Конструювання трансформуючого вектора pZU627 для тютюну

Усі ПЛР здійснюють з використанням ДНК-полімерази Platinum Pfx (фірма Life Technologies), відповідно до інструкцій виробника.

1. Ампліфікація термінатора NOS і клонування отриманого продукту

Термінатор NOS ампліфікують з pBIN19 (Bevan і ін. 1984) з використанням прямого праймера для термінатора NOS (SEQ ID NO:21) і зворотного праймера для термінатора NOS (SEQ ID NO:22). Прямий праймер модифікують таким чином, щоб він містив сайт PstI, а зворотний праймер модифікують таким чином, щоб він містив сайт HindIII. Продукт ампліфікації термінатора NOS клонують у вигляді PstI/HindIII-фрагмента в тих же сайтах вектора pBluescript (фірма Stratagene), одержуючи плазмиду pZU400A.

2. Ампліфікація і клонування гена нуклеокапсидного протеїну вірусу плямистого в'янення томата (NP TSWV)

При одержанні за допомогою ампліфікації нетрансльованого гена NP TSWV використовують модифіковані праймери для гена NP TSWV. У прямий праймер для гена NP TSWV вбудовують сайти BamHI, SphI, ініціюючий і термінуючий кодони (SEQ ID NO:23). Зворотний праймер модифікують таким чином, щоб він містив сайт PstI (SEQ ID NO:24). Ампліфікований продукт клонують у вигляді BamHI/PstI-фрагмента в сайті BamHI/PstI плазмиди pZU400A проти ходу транскрипції і тому ж напрямку, що і термінатор NOS. В отриманому клоні pZU400b сайт PstI, розташований між геном NP TSWV і термінатором NOS, видаляють шляхом обробки ДНК-полімеразою фага T4 (фірма Life Technologies) відповідно до інструкцій виробника. Ген NP TSWV і термінатор NOS з отриманого клону, позначеного як pZU400C, клонують у вигляді SphI/HindIII-фрагмента в сайті SphI/HindIII човникового вектора pZO1560, одержуючи плазмиду pZU400. pZO1560 є похідним вектора pBluescript, у якому вихідний сайт множинного клонування замінений сайтом множинного клонування AGLINK (SEQ ID NO:27).

3. Ампліфікація і клонування промотору вірусу CmYLCV

Промотор вірусу CmYLCV ампліфікують з використанням прямого праймера для промотору вірусу CmYLCV (SEQ ID NO:25) і зворотного прай-

мера для промотору вірусу CmYLCV (SEQ ID NO:26). Прямий праймер модифікують таким чином, щоб він містив сайт SstI, а зворотний праймер таким чином, щоб він містив сайт PstI. Ампліфікований промотор вірусу CmYLCV клонують у вигляді SstI/PstI-фрагмента в сайті SstI/PstI плазмиди pZU400 у тому ж напрямку і проти ходу транскрипції відносно гена NP TSWV. У результаті одержують клон pZU625, який містить касету вірусного гена, що дозволяє одержувати нетрансльовану РНК гена NP TSWV.

4. Клонування касети вірусного гена в pVictorHiNK

Касету вірусного гена клонують у вигляді AscI/PacI-фрагмента плазмиди pZU625 у сайті AscI/PacI вектора pZU494 у плазмиді pVictorHiNK. У результаті одержують рослинний трансформуючий вектор pZU627. pVictorHiNK представляє собою бінарний вектор, який містить сайт ініціації реплікації (ORI), виділений із плазмиди pVS1 *Pseudomonas aeruginosa*, у відношенні якого відомо, що він має високу стабільність у *A. tumefaciens* (Iron і ін., Plasmid 11:206-220 (1984); Itoh і Haas, Gene 36:27-36 (1985)). ORI pVS1 функціонує тільки в *Agrobacterium* і його можна мобілізувати у *A. tumefaciens* за допомогою плазмиди-хелпера pRK2013, яка походить з *E. coli*, з використанням процедури трибатьківського схрещування (Ditta і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351 (1980)).

Цей бінарний вектор містить також сайт ініціації реплікації ColEI, виділений з pUC19 (Yannisch-Perron і ін., Gene 33:103-119 (1985)), який функціонує в *E. coli*.

Для зберігання в *E. coli* і *A. tumefaciens* цей вектор містить бактеріальний ген стійкості до спектоміцину і стрептоміцину, який кодується геном транспозону Tn7, що має довжину 0,93 т.п.н. (Fling і ін., Nucl. Acid Res. 13:7095 (1985)), який функціонує як маркер для селекції за ознакою наявності вектора в *E. coli* і *A. tumefaciens*. Для підвищення ефективності бактеріальної експресії ген зливають із промотором tac (Amman і ін., Gene 25: 167-178 (1983)).

Правий і лівий пограничні фрагменти Т-ДНК довжиною 1,9 т.п.н. і 0,9 т.п.н. відповідно, які містять пограничні повтори довжиною 24 пари основ, одержують з Ті-плазмиди штамів *A. tumefaciens* нопалінового типу pTi137 (Yadav і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:6322-6326 (1982)). Потім ділянку Т-ДНК, розташовану між пограничними послідовностями, модифікують шляхом видалення послідовностей, які походять з M13, і для збільшення варіантів його клонування вбудовують сайт множинного клонування BIGLINK (SEQ ID NO:28), одержуючи pVictorHiNK.

pVictorHiNK містить генну касету NPTII для відбирання трансформантів у процесі трансформації рослин. Ця генна касета містить промотор NOS, ген NPTII і термінатор NOS, отриманий з *A. tumefaciens*.

Приклад 13: Трансформація рослин і скрінинг за ознакою стійкості

1. Трансформація рослинного матеріалу за допомогою бінарних векторів

Методи перенесення бінарних векторів у рослинний матеріал добре розроблені і відомі фахів-

цю в даній галузі. Є розходження в процедурах, зумовлені, наприклад, тим, що застосовують різні штамми *Agrobacterium*, різні джерела одержання експлантатів, різні системи регенерації, які залежать як від сорту, так і від виду використовуваної рослини. Бінарний вектор pZU627 в експериментах з трансформації рослин застосовують відповідно до описаної нижче процедури. pZU627 переносять шляхом трибатьківського схрещування в штам-акцептор *Agrobacterium tumefaciens*, після чого методом саузерн-блотингу здійснюють аналіз екз-кон'югантів для перевірки правильного перенесення конструкції в штам-акцептор, інокуляцію і спільне культивування стерильного експлантата з рекомбінантним штамом *Agrobacterium tumefaciens*, селективне знищення штаму *Agrobacterium tumefaciens* з використанням відповідних антибіотиків, селекцію трансформованих клітин шляхом вирощування на середовищах для селекції, які містять канаміцин, перенесення проростків у ґрунт, оцінку методом саузерн-блотингу ступеня інтактності інтегрованої Т-ДНК за допомогою аналізу виділеної хромосомний ДНК рослини.

2. Стійкість рослин до інфекцій, які викликаються TSWV

Трансформовані рослини вирощують у теплиці в стандартних карантинних умовах для того, щоб не допустити ніякої інфекції, яка викликається патогенами. На стадії чотирьох листків рослини заражають TSWV шляхом механічної інокуляції. Тканину рослин, системно інфікованих TSWV, подрібнюють у 5 об'ємах охолодженого на льоді буфера для інокуляції (10мМ фосфатний буфер, доповнений 1% Na₂SO₃) і натирають нею в присутності карборундового порошку два перші нові листки, які повністю розпустилися. Протягом трьох тижнів після інокуляції спостерігають розвиток симптомів захворювання в інокульованих рослин. У рослин, які містять послідовності pZU627, не виявлено симптомів захворювання, яке викликається TSWV, у той час як у нетрансформованих контрольних рослин протягом 7 днів після інокуляції проявляються серйозні симптоми системного захворювання, яке викликається TSWV. Стійкі рослини піддають самозапиленню і збирають насіння. Потомство рослин аналізують у відношенні сегрегації вбудованого гена і потім піддають повторному скрінингу за ознакою стійкості до TSWV-інфекції відповідно до описаної вище процедури.

Приклад 14: Створення конструкцій CmpS-фосфоманозо-ізомераза-pos для трансформації рослин

Промотор CmpS ампліфікують за допомогою ПЛР із використанням праймерів Cmpf-B (cgc gga tec tgg cag aca aag tgg cag a; SEQ ID NO:29) і CmpS-B (cgc gga tec tac ttc tag get act tg, SEQ ID NO:30), що мають фланкуючі сайти BamHI. Утворений PCR-фрагмент клонують у сайті BamHI pBluescript KS (+), одержуючи pNOV4211.

Для створення бінарного вектора, призначеного для трансформації з використанням *Agrobacterium tumefaciens*, промотор CmpS виділяють з pNOV4211 шляхом відщеплення за допомогою BamHI і вбудовують у розщеплений за допомогою BamHI вектор pNOV2804 (SEQ ID NO:31) проти ходу транскрипції відносно гена PMI, утво-

рений вектор позначають як pNOV2819. pNOV2804 (SEQ ID NO:31) представляє собою бінарний вектор, який містить сайт ініціації реплікації VSI, копію гена *virG* *Agrobacterium* у каркасній ділянці і позбавлену промотору касету експресії PMI-термінатор *nos* між лівою і правою пограничними послідовностями Т-ДНК. PMI (фосфоманозо-ізомераза) представляє собою кодувальну ділянку гена *mapA* *E.coli* (Joersbo і Okkels, Plant Cell Reports 16:219-221 (1996), Negrotto і ін., Plant Cell Reports 19:798-803 (2000)). Термінатор *nos* (нопалінсинтази) виділяють з Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker і ін., J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 561-573 (1982)). Кодувальна ділянка фосфоманозо-ізомерази і термінатора *nos* розташовані від нуклеотиду 290 до нуклеотиду 1465 і від нуклеотиду 1516 до нуклеотиду 1789 відповідно pNOV2804 (SEQ ID NO:31).

Для створення вектора, призначеного для біобалістичної трансформації, промотор *CmpS* відщеплюють від pNOV4211 за допомогою *Bam*HI і вбудовують у розщеплений за допомогою *Bam*HI вектор pNOV3604 (SEQ ID NO:32) одержуючи pNOV2820, у результаті чого створюється касета експресії PMI, яка знаходиться під контролем промотору *CmpS*. pNOV3604 представляє собою вектор для одержання призначених для біобалістичної доставки фрагментів, створений на основі pUC19, що містить сайт ініціації реплікації *ColEI* і ген бета-лактамази, який зумовлює стійкість до ампіциліну. Так само як і pNOV2804, pNOV3604 містить позбавлену промотору касету експресії PMI-термінатор *nos* (див. вище). Кодувальна ділянка фосфоманозо-ізомерази і термінатора *nos* розташовані від нуклеотиду 42 до нуклеотиду 1217 і від нуклеотиду 1268 до нуклеотиду 1541 відповідно pNOV3604 (SEQ ID NO:32).

Бінарний вектор pNOV2819 застосовують для трансформації з використанням *Agrobacterium tumefaciens*, а вектор pNOV2820 застосовують для біобалістичної трансформації.

Приклад 15: Конструювання *CmpC-GUS*-плазмід для стабільної експресії *in planta*.

1. Конструювання бінарного вектора

Для експериментів був вибраний вектор pCambia 1302 (Cambia, Canberra, Australia; Roberts, C.S., Rajagopal, S., Smith, L., Nguyen, T., Yang, W., Nugroho, S., Ravi, K.S. Cao, M.L., Vijayachandra, K., і ін. A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulation and efficient transformation of plants. Presented at the Rockefeller Foundation Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, Malacca, Malaysia, September 15-19 (1997)) і його модифікують у такий спосіб: промотор 35S *CaMV*, розташований перед геном GFP, видаляють шляхом розщеплення в положенні 9788 за допомогою ендонуклеази *Hind*III і в положенні 1 за допомогою ендонуклеази *Nco*I, і вектор повторно зшивають шляхом лігування по двох сумісних кінцях. Шляхом розщеплення за допомогою ендонуклеази *Xho*I у положенні 7613 і за допомогою *Bst*XI у положенні 9494 видаляють ген стійкості до гігromіцину і промотор 35S *CaMV*, що знаходиться перед ним. Послідовності промотору 35S видаляють з вектора для того, щоб виключити будь-який можливий ризик того, що внаслідок гомології ген виявиться мовчазним. Ген *bar*,

що знаходиться під контролем промотору 1' (Mengiste і ін., Plant J, 12(4): 945-948 (1997)), вбудовують у сайт *Eco*RI у положенні 9737 як селективний маркер. Отриманий вектор позначають як pCamBar.

2. Отримані конструкції

Касети *CmpCG* і *CapG*, описані в прикладі 3, вбудовують у вектор pCamBar між сайтом *Xba*I у положенні 9764 і сайтом *Eco*RI у положенні 9737, одержуючи плазмиди pCamBarCmpCG і pCamBarCapG відповідно. Обидві конструкції використовують для трансформації клітин *Agrobacterium tumefaciens*.

Приклад 16: Стабільна експресія в *Arabidopsis thaliana*

1. Одержання і трансфекція рослин

Висівають насіння *Arabidopsis thaliana* (Columbia 0) дикого типу, які витримували протягом 3 днів у холодних умовах при 4°C у темряві для синхронізації проростання, і переносять у вегетаційну камеру (22°C/освітлення протягом 24 год). Пророслі рослини піддають інфільтрації, коли в них утворюється максимальна кількість нерозкритих бруньок. Інфільтрацію здійснюють відповідно до протоколу, описаному в Clough і Bent, Plant J. 16: 735-743 (1987).

2. Відбір трансгенних рослин

Здійснюють відбір проростків з насіння покоління T1, обприскуючи їх гербіцидом BASTA (фірма Pluss-Stauffer AG/SA) (150мг/л) три рази через кожні п'ять днів. Шляхом відбору одержують двадцять стійких до pCamBarCmpCG і дев'ять стійких до pCamBarCapG рослин. Їх вирощують в описаних умовах, одержуючи насіння покоління T2. Це насіння піддають процедурі, описаній вище для рослин дикого типу, відбирають проростки покоління T2 з використанням обприскування гербіцидом BASTA і здійснюють аналіз стійких мутантів у відношенні експресії гена GUS.

3. Гістохімічне дослідження експресії гена GUS у стабільно трансформованих рослинах *Arabidopsis*

Гістохімічне фарбування для виявлення GUS здійснюють відповідно до методу, описаному в прикладі 11. Аналіз проводять у пробірках з культурою об'ємом 15мл шляхом занурення трансформованих проростків у розчин X-Gluc, витримування протягом 10хв при тиску 130мбар і інкубації протягом ночі при 37°C. Результати, отримані для рослин *Arabidopsis*, трансформованих за допомогою pCamBarCmpCG, свідчать про наявність у всіх вегетативних органах конститутивної експресії репортерного гена GUS, що здійснюється під контролем промотору *CmpC*.

4. Кількісний ферментативний аналіз GUS у стабільно трансформованих рослинах *Arabidopsis*

A. Одержання зразків

Для дослідження відбирають по чотири рослини для кожної трансгенної лінії і з кожної з цих рослин беруть по одному листку. Чотири листки вносять в одну пробірку Еппендорфа, заморожують за допомогою рідкого азоту і розмелюють за допомогою відповідних млинів до одержання тонкоподрібненого порошку. Порошок розбавляють 150мкл GUS-буфера (0,05M NaPO_4 , pH 7, 0,01M ЕДТК, 0,1% Triton-X-100, 0,1% саркозилу), інкубу-

ють протягом 5хв при 37°C і продукт обертають у мікроцентрифузі протягом 5хв при максимальній швидкості. Супернатант переносять у нову пробірку Еппендорфа й отримані зразки використовують для ферментативного аналізу.

Вміст протеїну в вказаних рослинних екстрактах оцінюють за методом Бредфорда (Bradford M.M., Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)), використовуючи як стандарт БСА (бичачий сироватковий альбумін). Присутність промотору і гена GUS у мутантних лініях підтверджують за допомогою ПЛР-аналізу, використовуючи екстраговані зразки як матрицю.

Б. Флуорометричний аналіз GUS

Флуорометричний аналіз GUS проводять відповідно до методу, описаному в прикладі 5. Для виявлення експресії гена GUS зразки розбавляють GUS-буфером. Реакцію проводять при 37°C у присутності однакових кількостей GUS-буфера для реакції і припиняють шляхом додавання 2М амедалу. Активність вимірюють за допомогою пристрою типу Titertek Fluoroskan II.

У п'ятнадцяти з двадцяти відібраних ліній, трансформованих за допомогою рCamBarCmpCG, і у восьми з дев'яти ліній, трансформованих за допомогою рCamBarCapG, виявлена ферментативна активність GUS у листках. Рівень активності для деяких ліній, трансформованих за допомогою CmpCG, виявився порівняним з рівнем активності ліній, трансформованих за допомогою CapG. Однак результати змінюються для різних трансгенних ліній внаслідок відмінностей їх генотипів (кількість локусів і кількість трансгенних вставок у кожен локус).

Приклад 17: Конструювання варіантів промотору CmpC

Усі ПЛР здійснюють з використанням полімерази Pm (фірма Stratagene) відповідно до методу, описаному в прикладі 1.

1. Ампліфікація і клонування ДНК

Одержують два варіанти плазмиди рCmpCG (приклад 3), а саме рCmpMG і рCmpMsG. У першій в промоторі рCmpCG відсутня послідовність "GTGGTCCC", а в останньої вказана послідовність у результаті мутації перетворена в послідовність "GTGCTCGC".

Для одержання рCmpMG ампліфікують три ПЛР-продукти:

CmpM1 - з використанням прямого праймера Cmp1 (див. приклад 3, SEQ ID NO:13), зворотного праймера CmpMr (CCATCGTGGTATTTGGTATTG, SEQID NO:33) і плазмиди рCmpCG як матриці.

CmpM2 - з використанням прямого праймера CmpMf (CAATACCAAATACCACGATGG; SEQ ID NO:34), зворотного праймера CmpC2 (див. приклад 3; SEQID NO:14) і плазмиди рCmpCG як матриці.

CmpM - з використанням прямого праймера Cmp1, зворотного праймера Cmp2 і еквімолярної суміші ПЛР-продуктів CmpM1 і CmpM2 як матриці.

Для одержання рCmpMsG ампліфікують три ПЛР-продукти:

CmpMs1 - з використанням прямого праймера Cmp1, зворотного праймера CmpMrs (CGTGGTAGCGAGCACTTTGGT, SEQ ID NO:35) і плазмиди рCmpCG як матриці.

CmpMs2 - з використанням прямого праймера CmpMfs (AAGTGCTCGCTACCACGATGG, SEQ ID NO:36), зворотного праймера Cmp2 і плазмиди рCmpCG як матриці.

CmpsM - з використанням прямого праймера Cmp1, зворотного праймера Cmp2 і еквімолярної суміші ПЛР-продуктів CmpMs1 і CmpMs2 як матриці.

Для одержання плазмид рCmpMG і рCmpMsG вихідну плазмиду рCmpCG розщеплюють за допомогою ендонуклеаз XbaI і BamHI для того, щоб виключити фрагмент CmpC і замість нього вбудувати ПЛР-продукти CmpM і CmpMs.

Приклад 18: Експерименти із здійснення короточасної експресії з використанням конструкцій рCmpM і рCmpMs

1. Одержання суспензійних культур і протопластів

Суспензійні культури і протопласти одержують відповідно до процедури, описаної в прикладі 4.

2. Аналіз GUS

Трансфекцію й одержання протеїнових екстрактів здійснюють відповідно до процедури, описаної в прикладі 4, а аналіз GUS проводять відповідно до процедури, описаної в прикладі 5.

Результати аналізу GUS представляють собою середні значення результатів десяти різних експериментів і їх нормалізують по відношенню до значення для стандартного клону. Делеція послідовності "GTGGTCCC" у конструкції CmpCG приводить до зниження експресії репортерного гена GUS під контролем CmpC приблизно на 50% у всіх типах протопласта (див. нижче). Ефект, який викликається мутацією "GTGCTCGC" залежить від виду рослини. У протопластах *O. violaceus* і *O. sativa* рівень експресії гена GUS знижується на 65,2% і 73,6% відповідно. У протопластах *N. plumbaginifolia* активність промотору CmpMs близька до активності промотору CmpM.

N. plumbaginifolia

CmpCG	100
CmpMG	52 +/-12%
CmpMsG	53,7 +/-16%
CapG	28,3 +/-14%

O. violaceus

CmpCG	100
CmpMG	55,2 +/-12%
CmpMsG	73,6 +/-10%
CapG	5 +/-1%

O. sativa

CmpCG	100
CmpMG	9,6 +/-21%
CmpMsG	65,2 +/-20%
CapG	42,5 +/-16%

Приклад 19: Конструювання рослинних трансформуючих векторів, які містять 5'-промоторні фрагменти, функціонально зв'язані з репортерними генами GFP або GUS

1. Ампліфікація і клонування промотору

Конструюють химерний ген, який містить послідовність ДНК промотору первинного транскрипту

CmYLCV (SEQ ID NO:1), зливу з оптимізованою для рослини послідовністю GFP, що містить інтрон (synGFPI, SEQ ID NO:37), або з послідовністю репортерного гена GUS, що містить інтрон (GIG; SEQ ID NO:38). Ген GIG містить інтрон ST-LSI з *Solatum tuberosum*, який розташований від нуклеотиду 385 до нуклеотиду 576 SEQ ID NO: 38 (отриманий від д-ра Stanton Gelvin, Purdue University, описаний Narasimhulu і ін., Plant Cell, 8: 873-886 (1996)). SynGFPI представляє собою оптимізований для рослини ген GFP, у який вбудований інтрон ST-LSI (від нуклеотиду 278 до нуклеотиду 465 SEQ ID NO:37). Для ампліфікації промоторів як матриці при здійсненні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовують геномну ДНК CmYLCV. Для ампліфікації послідовності ДНК конструюють специфічні для гена праймери. Фрагмент гена, який відповідає CmpC (SEQ ID NO:2) виділяють з використанням прямого праймера Cmpf-B (SEQ ID NO:29) у сполученні з 5'-3' праймером CGCGGATTGCTCCCTTAACAATGAGG (SEQ ID NO:39) як зворотного праймера. Фрагмент гена, що відповідає CmpS (SEQ ID NO:3) виділяють з використанням прямого праймера Cmpf-B (SEQ ID NO:29) у сполученні зі зворотним праймером

CmpS-B (SEQ ID NO:30). Усі три праймери містять на своїх 5'-кінцях сайт CGCGGA, який розпізнається рестриктазою BamHI. Усі ПЛР здійснюються з використанням полімерази Pfu відповідно до рекомендацій виробника (фірма Stratagene). Для ампліфікації промоторних фрагментів застосовують термоциклінг (типу DNA Engine, фірма MJResearch, Inc., Уолтем, штат Массачусетс, США) і використовують наступні умови для ПЛР: [(94°C:10с):(94°C:10с/56°C:30с/72°C:1хв)x20]:(72°C:1,5хв)]. Після розщеплення рестриктазою BamHI промоторні фрагменти зшивають шляхом літування у векторах, створених на основі pUC, з геном GIG або геном synGFPI, у результаті чого одержують злиття промотор-репортерний ген, функціонально зв'язані з термінатором nos.

2. Отримані касети промотор-репортерний ген промоторний фрагмент CmpS + ген synGFPI + nos (SEQ ID NO:40)
- промоторний фрагмент CmpS + ген GIG + nos (SEQ ID NO:41)
- промоторний фрагмент CmpC + ген synGFPI + nos (SEQ ID NO:42)
- промоторний фрагмент CmpC + ген GIG + nos (SEQ ID NO:43)

SEQ ID NO	Промотор	Ген (synGFPI або GIG)	Термінатор
40	Нуклеотиди з 1 по 402	Нуклеотиди з 411 по 1331	Нуклеотиди з 1343 по 1618
41	Нуклеотиди з 1 по 405	Нуклеотиди з 425 по 2425	Нуклеотиди з 2479 по 2751
42	Нуклеотиди з 1 по 354	Нуклеотиди з 380 по 1292	Нуклеотиди з 1304 по 1577
43	Нуклеотиди з 1 по 354	Нуклеотиди з 399 по 2399	Нуклеотиди з 2453 по 2725

3. Субклоновані в бінарному векторі *Agrobacterium*

Касети промотор-репортерний ген (SEQ ID NO:40-43), які містять промоторний фрагмент, репортерний ген і термінатор nos, вбудовують у бінарний вектор pNOV2117, призначений для трансформації кукурудзи, і в бінарний вектор pNOV4200, призначений для трансформації томатів. pNOV2117 (SEQ ID NO:44) представляє собою бінарний вектор, який містить у каркасній ділянці сайт ініціації реплікації VSI, копію гена virG *Agrobacterium*, а також касету експресії промотор убікітину кукурудзи-ген PMI-термінатор nos, розташовану між лівою і правою пограничними послідовностями Т-ДНК. PMI (фосфоманозо-ізомераза) представляє собою кодуючу ділянку гена mapA *E.coli* (Joersbo і Okkels, Plant Cell Reports 16:219-221 (1996), Negrotto і ін., Plant Cell Reports 19:798-803 (2000)). Термінатор nos (нопалінсинтази) виділяють з Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker і ін., J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 561-573 (1982)). Промотор убікітину кукурудзи, кодуюча ділянка фосфоманозо-ізомерази і термінатор nos розташовані від нуклеотиду 31 до нуклеотиду 2012, від нуклеотиду 2109 до нуклеотиду 3212 і від нуклеотиду 3273 до нуклеотиду 3521 відповідно pNOV2117 (SEQ ID NO:44). Касети репортерний ген-промотор вбудовують максимально близько до правої пограничної послідовності. Касету експресії, яка містить селектований маркер, вбудовують у бінарні вектори максимально близько до лівої пограничної послідовності.

Для трансформації томатів як бінарний вектор використовують pNOV4200 (SEQ ID NO:45), який

містить у каркасній ділянці сайт ініціації реплікації VSI, копію гена virG *Agrobacterium* і касету, яка містить селектований маркер за ознакою стійкості до гігromіцину, розташовану між лівою і правою пограничними послідовностями. Касета із селектованим маркером за ознакою стійкості до гігromіцину містить промотор убікітину 3 *Arabidopsis* (Ubiq3(At), Callis і ін., J. Biol. Chem. 265:12486-12493 (1990)), функціонально зв'язаний з геном, який кодує стійкість до гігromіцину (у даному описі позначений як "HYG", синтетичний ген гігromіцин В-фосфотрансферази з *E.coli*, патент: JP 1986085192-A 1 30-APR-1986) і термінатор nos (Depicker і ін., J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 561-573 (1982)). Промотор убікітину *Arabidopsis*, ген HYG і термінатор nos розташовані від нуклеотиду 162 до нуклеотиду 11494, від нуклеотиду 1897 до нуклеотиду 2939 і від нуклеотиду 2939 до нуклеотиду 3236 відповідно pNOV4200 (SEQ ID NO:45). Касети репортерний ген-промотор (SEQ ID NO:40 - 43) вбудовують максимально близько до правої пограничної послідовності. Касети експресії, які містять селектований маркер, вбудовують у бінарні вектори максимально близько до лівої пограничної послідовності.

Нижче наведені орієнтації селектованого маркера і касет промотор-репортерний ген у конструкціях бінарних векторів.

4. Конструкції бінарних векторів:

NOV4215 (суміжний із правою пограничною послідовністю промоторний фрагмент (RB-фрагмент) CmpS + ген synGFPI + nos - ZmUbi + ген PMI + nos, суміжний із лівою пограничною послідовністю (LB-nos))

NOV4216 (RB-nos + ген synGFPI + промоторний фрагмент CmpS - ZmUbi + ген PMI + LB-nos)

NOV4217 (RB-промоторний фрагмент CmpS + ген synGFPI + nos - Ubq3(At) + ген HYG + LB-nos)

NOV4220 (RB-промоторний фрагмент CmpS + ген GIG + nos - Ubq3(At) + ген HYG + LB-nos)

NOV4224 (RB-промоторний фрагмент CmpC + ген GIG + nos - ZmUbi + ген HYG + LB-nos)

NOV4226 (RB-промоторний фрагмент CmpC + ген synGFPI + nos - ZmUbi + ген PMI + LB-nos)

З метою порівняння конструюють додаткові касети з використанням відомих промоторів. Для цього створюють також промоторну касету, яка містить ZmUbi-GFP-35S term (SEQ ID NO:46), що містить промотор убікітину кукурудзи (Christensen / ін. Plant Molec. Biol. 12: 619-632 (1989)), функціонально зв'язаний з synGFP, і термінатором 35S (35S term), і промоторну касету, яка містить промотор убікітину, функціонально зв'язаний з геном GIG, і термінатором nos (NOV 3612, SEQ ID NO:47). Промотор ZmUbi, ген GFP і термінатор 35S розташовані від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 2019, від нуклеотиду 2020 до нуклеотиду 2751 і від нуклеотиду 2876 до нуклеотиду 2949 відповідно SEQ ID NO:46. Промотор ZmUbi, ген GIG і термінатор nos розташовані від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 1982, від нуклеотиду 2015 до нуклеотиду 4015 і від нуклеотиду 4069 до нуклеотиду 4341 відповідно SEQ ID NO:47. Касету ZmUbi-GIG-nos (SEQ ID NO: 47) клонують у векторі, створеному на основі pUC. Касету ZmUbi-GFP-nos (SEQ ID NO:46) клонують у бінарному векторі pNOV2117, призначеному для трансформації кукурудзи, відповідно до описаного вище методу. Конструюють промоторні касети, які містять промотор убікітину 3 Arabidopsis (Ubq3(At)), функціонально зв'язаний з synGFPI, і термінатор nos (SEQ ID NO:48), промотор убікітину 3 Arabidopsis, функціонально зв'язаний з геном GIG, і термінатор nos (SEQ ID NO:49). Промотор убікітину 3, synGFPI і термінатор nos розташовані від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 1332, від нуклеотиду 1738 до нуклеотиду 2658 і від нуклеотиду 2670 до нуклеотиду 2943 відповідно SEQ ID NO: 48. Промотор убікітину 3, ген GIG і термінатор nos розташовані від нуклеотиду 1 до нуклеотиду 1335, від нуклеотиду 1746 до нуклеотиду 3746 і від нуклеотиду 3800 до нуклеотиду 4072 відповідно SEQ ID NO: 49. Як описано вище, касети, які включають промотор, клонують у бінарному векторі pNOV4200, що включає касету, яка включає селективний за ознакою стійкості до гігromіцину маркер, призначену для трансформації томатів. Нижче наведені орієнтації селективного маркера і касет промотор-репортерний ген у конструкціях бінарних векторів.

5. Конструкції бінарних векторів

NOV2110 (RB-промотор ZmUbi + ген synGFP + 35S term - ZmUbi + ген PMI + LB-nos)

NOV4209 (RB-промотор Ubq3(At) + ген synGFPI + nos - Ubq3(At) + ген HYG + LB-nos)

NOV4208 (RB-промотор Ubq3(At) + інтрон GUS - ген GUS + nos - Ubq3(At) + ген HYG + LB-nos)

Приклад 20: Трансформація рослин кукурудзи, опосередковувана *Agrobacterium*

Трансформацію незрілих зародків кукурудзи здійснюють в основному відповідно до методу,

описаному в Negrotto і ін., Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000). У розглянутому прикладі як усі компоненти, що входять до складу середовища, використовували компоненти, описані в Negrotto і ін., див. вище. Слід мати на увазі, що різні компоненти середовища, вказані в літературі, можна замінити на інші.

1. Трансформуючі плазмиди і селективний маркер

Гени, які використовують для трансформації, клонують у векторі, придатному для трансформації кукурудзи, відповідно до методу, описаному в прикладі 19. Застосовувані вектори містять ген фосфоманозо-ізомерази (PMI) (Negrotto і ін. Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000)).

2. Одержання штаму *Agrobacterium tumefaciens*

Штам *Agrobacterium* LBA4404 (pSBI), який містить плазмиду для трансформації рослин, вирощують протягом 2-4 днів при 28°C у твердому середовищі YEP (дріжджовий екстракт (5г/л), пептон (10г/л), NaCl (5г/л), агар (15г/л), pH 6,8). Приблизно $0,8 \times 10^9$ агробактерій суспендують у середовищі LS-inf, доповненому 100мкМ ацетосирінгоном (As) (Negrotto / ін., Plant Cell Rep 19: 798-803 (2000)). Бактерії піддають попередній індукції в цьому середовищі протягом 30-60хв.

3. Інокуляція

Незрілі зародки лінії A188 або іншого придатного генотипу кукурудзи вирізують з 8-12-денних качанів і поміщають у рідке середовище LS-inf + 100мкМ As. Зародки промивають один раз свіжим інфікуючим середовищем. Потім додають розчин, який містить *Agrobacterium*, зародки перемішують протягом 30с, після чого дають осадитися на них бактеріям протягом 5хв. Потім зародки поміщають у LSAs-середовище так, щоб щиток розташовувався зверху, і культивують у темряві протягом 2-3 днів. Потім зародки переносять (по 20-25 зародків на чашку Петрі) у LSDс-середовище, доповнене цефотаксимом (250мг/л) і нітратом срібла (1,6мг/л) і культивують у темряві при 28°C протягом 10 днів.

4. Відбір трансформованих клітин і регенерація трансформованих рослин

Незрілі зародки, що продукують ембріогенний калюс, переносять у середовище LSD1M0.5S. Культури піддають селекції в цьому середовищі протягом 6 тижнів, здійснюючи стадії пересівання через 3 тижні. Калюси, які вижили, переносять або в середовище LSD1M0.5S для збільшення їх об'єму, або в середовище Reg1. Після культивування на світлі (світловий режим: 16 год світла/8 год темряви), зелені тканини переносять у середовище Reg2, яке не містить регуляторів росту, і інкубують протягом 1-2 тижнів. Проростки переносять у коробки типу Magenta GA-7 (фірма Magenta Corp, Чикаго, штат Іллінойс), які містять середовище Reg3, і вирощують на світлі. Рослини, у яких виявлена позитивна відповідь при проведенні ПЛР на наявність касети промотор-репортерний ген, переносять у ґрунт і вирощують у теплиці.

Приклад 21: Стабільна трансформація томатів

Трансформацію томатів здійснюють, практично дотримуючись методу, описаному в Meissner і ін., The Plant Journal 12: 1465-1472 (1997).

1. Трансформуючі плазмиди і селективний

маркер

Гени, які використовують для трансформації, клонують у бінарному векторі, придатному для трансформації томатів, відповідно до методу, описаному в прикладі 19. Вектори містять ген стійкості до гігromіцину, призначений для селекції.

2. Одержання штаму *Agrobacterium tumefaciens*

Штам *Agrobacterium* GV3101, який містить плазмиду для трансформації рослин, культивують протягом 2 днів при 22°C у рідкому середовищі LB (дріжджовий екстракт (5г/л), пептон (10г/л), NaCl (5г/л), агар (15г/л), pH 6,8). Приблизно $0,8 \times 10^9$ агробактерій суспендують у середовищі KCMS для інокуляції (MS-солі (4,3г/л), Муo-інозит, тіамін (1,3мкг/мл), 2,4-Д (0,2мкг/мл), кінетин (0,1мкг/мл) і 3% сахарози, pH 5,5), доповнене 100мкМ ацетосирингоном. Бактерії піддають попередній індукції в цьому середовищі протягом 30-60хв.

3. Стерилізація і пророщення насіння

Насіння томатів сорту Micro-Tom (Meissner і ін., The Plant Journal 12: 1465-1472 (1997)) і сортів ZTV-840 пророщують протягом 20хв 20%-ним розчином хлорного вапна, який містить Tween. Потім насіння тричі промивають стерильною водою і висівають для пророщення на середовище TSG (MS-солі половинної міцності, 1% сахарози, 1% фітоагару, pH 5,8) у коробки типу Magenta (фірма Magenta Corp, Чикаго, штат Іллінойс). Через 7-10 днів після проростання вирізують сім'ядолі і черешки сім'ядоль розрізають на сегменти довжиною 5мм.

4. Інокуляція

7-10-денні сім'ядолі і сегменти черешків сім'ядоль перед здійсненням інокуляції з використанням *Agrobacterium* інкубують протягом 24 год на планшетах, що містять як поживні клітини клітини тютюну лінії BY-2 (MS-солі, Муo-інозит (0,1мг/мл), гідролізат казеїну (0,2мг/мл), тіамін-HCl (1,3мкг/мл), 3% сахарози, pH 5,5).

Сім'ядолі занурюють на 5хв у рідку суспензію KCMS, яка містить *Agrobacterium*. Потім 20-25 сім'ядоль поміщають абаксальною стороною вгору на ті ж самі планшети, які містять поживні клітини, і культивують у темряві протягом 2-3 днів.

5. Відбір трансформованих сім'ядоль і черешків і регенерація трансформованих рослин

Сім'ядолі і фрагменти черешків переносять на середовище для селекції TSM-1 (4,3г/л MS-солей, вітаміни B5 (1х), 2% сахарози, 1% глюкози, 1мкг/мл зеатину, 0,05мкг/мл ІОК, 5мкг/мл гігromіцину і 250мкг/мл карбеніциліну, pH 5,8) через 2-3 дні після інокуляції з використанням *Agrobacterium* і вирощують на світлі. Сім'ядолі і сегменти черешків, які продукують ембріогенний калюс, переносять на середовище TSM-2 (MS-солі (4,3г/л), MS-вітаміни (1х), 2% сахарози, 1мкг/мл зеатину, 5мкг/мл гігromіцину і 250мкг/мл карбеніциліну, pH 5,8). Проростки, які вижили, що утворюють калюс, переносять у коробки типу GA-7 (фірма Magenta Corp, Чикаго, штат Іллінойс) із середовищем TRM

(4,3г/л MS-солі, MS-вітаміни (1х), 2% сахарози, pH 5,8) і вирощують на світлі. Після формування коренів первинні трансформанти переносять у ґрунт.

Приклад 22: Флуорометричний аналіз зеленого флуоресцентного протеїну (GFP)

Для виявлення експресії гена *synGFP* здійснюють флуорометричний аналіз.

Диски листків стабільно трансформованих рослин кукурудзи і томатів заморожують за допомогою сухого льоду. Заморожену тканину ретельно подрібнюють і змішують з 300мкл буфера для екстракції GFP (10мМ Трис-HCl (р 7,5), 100мМ NaCl, 1мМ MgCl₂, 10мМ ДТТ (дитіотреїтол) і 0,1% саркозилу). Екстракти відокремлюють від дебрису листя шляхом центрифугування, після чого переносять у 96-лунковий планшет чорного кольору з прозорим дном (типу Costar 3615). Відносні одиниці флуоресценції (RFU) вимірюють за допомогою планшет-ридера типу Spectra Fluor Plus при довжині хвилі збудження 465нм і довжині хвилі випромінювання 512нм. Активність GFP нормалізують по відношенню до активності загального протеїну, яка виміряна на основі аналізу з використанням BCA (відповідно до методу Пірса (Pierce)).

Приклад 23: Аналіз експресії в стабільно трансформованих рослинах кукурудзи і томатів

1. Трансгенні рослини *Zea mays* лінії To

Експресія GFP, яка здійснюється під контролем промотору *CmpS* (NOV4215, NOV4216), у 10-20 разів перевищує експресію, яка здійснюється під контролем промотору *ZmUbi* (NOV2110). Ці результати були отримані з використанням зразків листя 42 незалежних ліній To, взятих від 93 рослин ліній To.

2. Аналіз GFP за допомогою методу ELISA

Для виявлення зеленого флуоресцентного протеїну (GFP) здійснюють кількісний сендвіч-імуноаналіз. Використовують два поліклональних антитіла, яка надходять у продаж. За допомогою імуноафінної хроматографії очищують козліне антитіло до GFP IAP (фірма Rockland, №600-1-1-215), а кроляче антитіло до GFP (фірма Torrey Pines Biolabs, №TP401) очищують з використанням протеїну A. Протеїн GFP у рослинних екстрактах захоплюють кролячим антитілом, іммобілізованим на твердій основі в титраційному мікропланшеті. Потім утворюється «сендвіч», який складається з кролячого антитіла, іммобілізованого на твердій основі, протеїну GFP і другого козліного антитіла, яке присутнє у лунці. Після стадії промивання, під час якої видаляють незв'язане друге антитіло, проводять виявлення зв'язаного антитіла з використанням антитіла, міченого за допомогою лужної фосфатази. Додають субстрат для ферменту й у кожній лунці оцінюють зміну забарвлення шляхом вимірювання рівня поглинання. Потім дані апроксимують стандартною кривою і будують графік залежності концентрації GFP від рівня поглинання.

Репортерний ген *syn GFP*

Касета бінарного вектора	Активність GFP (середня) RFU/мг протеїну	ELISA (середнє значення) нг GFP/мг протеїну
NOV4215 (CmpS)	4722,3	657,1
NOV4216 (CmpS)	2795,8	246,1
NOV2110 (ZmUbi)	272,0	41,4

2. Рослини *Lycopersicon esculentum* лінії To
Присутність промоторного фрагмента CmpS CmYLCV (NOV 4217) приводить до рівня експресії synGFP, що істотно перевищує рівень експресії в присутності промотору Ubq3 *Arabidopsis* (NOV 4209).

Репортерний ген synGFP

Результати були отримані шляхом оцінки за

допомогою мікроскопа інтенсивності флуоресценції synGFP у калюсі і первинних проростках для 5 незалежних стабільно трансформованих ліній калюсу, для трансформації яких використовували касету NOV4217, і 2 незалежних стабільно трансформованих ліній калюсу, для трансформації яких використовували касету NOV4209.

Касета бінарного вектора (промотор)	Калюс №	Інтенсивність флуоресценції GFP
NOV4217 (CmpS)	NOV4217-1	+++++
NOV4217 (CmpS)	NOV4217-2	++++
NOV4217 (CmpS)	NOV4217-3	++++
NOV4217 (CmpS)	NOV4217-4	+++
NOV4217 (CmpS)	NOV4217-5	+++
NOV4209 (Ubq3(At))	NOV4209-1	+
NOV4209 (Ubq3 (At))	NOV4209-2	+

Касета Gus-інтрон-репортерний ген GUS

Результати одержують шляхом оцінки інтенсивності забарвлення GUS для 11 незалежних стабільно трансформованих ліній калюсу, які містять касети промотор CmpS-репортерний ген (лінії NOV4220-1 - NOV4220-11). Досліджують дві стабі-

льно трансформовані лінії, які містять промоторний фрагмент CmpC промотору CmYLCV (NOV4224-1, NOV4224-2). Для порівняння використовують дві стабільно трансформовані лінії калюсу, які містять промотор убікітину 3 (Ubq3) *Arabidopsis*, (NOV4208-1, NOV4208-2).

Касета бінарного вектора (промотор)	Калюс №	Фарбування GUS
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-1	++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-2	+++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-3	++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-4	+++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-5	+++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-6	+++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-7	+++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-8	+++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-9	++++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-10	+++
NOV4220 (CmpS)	NOV4220-11	++++
NOV4224 (CmpC)	NOV4224-1	++++
NOV4224 (CmpC)	NOV4224-2	+++
NOV4208 (Ubq3 (At))	NOV4208-1	+
NOV4208 (Ubq3 (At))	NOV4208-2	++

Приклад 24: Експерименти із короткочасної експресії в рослинах кукурудзи

1. Одержання зародків

Незрілі зародки вирізують з 8-12-денних качанів рослин кукурудзи, які мають генотип A188, або інший придатний генотип, і поміщають у рідке середовище 2DG4 + 0,5d (модифіковане середовище Дункана D, яке містить 20мг/л глюкози і доповнене 10г/л манози) і культивують протягом 1-2 днів.

2. Плазмоліз

Незрілі зародки інкубують у 12%-ному розчині

сахарози протягом 3-4 год до початку бомбардування. Зародки розташовують на пластині по колу діаметром 8-10мм.

3. Бомбардування

Трансфекцію зародків кукурудзи шляхом бомбардування частинками здійснюють у присутності 5мкг плазмідної ДНК при тиску 650 фунтів/кв. дюйм відповідно до методу, описаному в Wright і ін, 2001, Plant Cell Reports, в друці. Оскільки роботу, яка знаходиться в друці, не можна використовувати як посилання, нижче наводяться деякі відомості, почерпнуті зі статті:

Фрагмент ДНК осаджують на золоті мікроносії (<1мкм) відповідно до інструкцій, викладених у посібнику DuPont Biolistics Manual. Гени вводять у клітини тканини-мішені за допомогою біобалістичного пристрою типу PDS-1000He Biolistics. Установлюють наступні регульовальні параметри: відстань 8мм між диском, що руйнується, і макроносієм, відстань 10мм між макроносієм і затримуючим екраном і відстань 7мм між затримуючим екраном і мішенню. Пластини обстрілюють двічі частинками, покритими ДНК, використовуючи диски, що руйнуються, при тиску 650 фунтів/кв. дюйм. Для зменшення пошкодження тканини від ударної хвилі при викиді гелію між затримуючим екраном і тканиною-мішенню поміщають сітку з нержавіючої сталі, яка має по вертикалі і по горизонталі по 200 отворів на дюйм (фірма McMaster-Carr, Нью Брунсвік, штат Нью Джерсі).

Зародки вирощують на планшетах протягом 48 год у темряві при 25°C. Протеїнові екстракти одержують шляхом лізису клітин у лізуючому GUS-буфері й освітляють шляхом центрифугування.

Приклад 25: аналіз GUS

Для виявлення експресії гена GUS здійснюють гістохімічний і хемілюмінісцентний аналізи.

1. Гістохімічний аналіз β-глюкуронідази (GUS)

При проведенні аналізу GUS використовують зародки кукурудзи і лінії калюсу томатів, вирощені в умовах *in vitro*. У розчин для фарбування GUS занурюють або зародки повністю, або невеликі шматочки калюсу. Розчин для фарбування GUS містить 1мМ 5-бром-4-хлор-3-індолілглюкуронід (X-Gluc, фірма Duchefa, 20мМ маточний розчин у

ДМСО), 100мМ Na-фосфатний буфер, pH 7,0, 10мМ ЕДТК, pH 8,0, і 0,1% Triton X100. Зразки тканини інкубують при 37°C протягом 1-16 год. При необхідності зразки освітляють шляхом декількох промивань 70% EtOH для видалення хлорофілу.

2. Хемілюмінісцентний аналіз β-глюкуронідази (GUS)

Для кількісного аналізу експресії GUS здійснюють хемілюмінісцентний аналіз GUS з використанням набору типу GUS-Light (фірма Tropix, Inc.) відповідно до інструкцій виробника. Активність вимірюють за допомогою люмінометра.

Результати вимірювань експресії GUS для зразків, у яких присутні конструкції pCmpS і pCmpMG (приклад 17) нормалізують по відношенню до відповідного значення, отриманого для кло-ну, з яким проводиться порівняння (pNOV3612, приклад 19). Результати, отримані в двох різних експериментах, свідчать про те, що делеція довжиною 8 пар основ у промоторі CmYLCV (pCmpMG, приклад 17) істотно не впливає на рівні експресії репортерного гена GUS у порівнянні з ев присутності промотору pCmpS.

Короткочасна експресія в зародках *Z.mays*

Активність GUS через 48 і 72 год після трансфекції

Конструкція №	Активність GUS (RFU/мг протеїну)	
	48 год	72 год
pCmpS	103,7	51,7
PCmpMG	81,4	70,8
ZmUbi (pNOV3612)	52,6	70,2

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Syngenta Participations AG
 <120> Промотори вірусу жовтого скручування листя цестрових
 <130> S-31359A
 <140>
 <141>
 <150> GB 0007427.8
 <151> 2000-03-27
 <150> GB 0010486.9
 <151> 2000-04-28
 <150> EP 01101802.5
 <151> 2001-01-26
 <150> US
 <151> 2001-02-28
 <160> 49
 <170> PatentIn Ver. 2.2
 <210> 1
 <211> 670
 <212> ДНК
 <213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 1
 attactggca gacaaagtgg cagacatact gtcccacaaa tgaagatgga atctgtaaaa 60
 gaaaaacgct gaaataatgc gtctgacaaa ggtaggtcg gctgccttta atcaatacca 120
 aagtgggtccc taccacgatg gaaaaactgt gcagtcggtt tggctttttc tgacgaacaa 180
 ataagattcg tggccgacag gtgggggtcc accatgtgaa ggcattctca gactccaata 240
 atggagcaat gacgtaaggc cttacgaaat aagtaagggt agtttgggaa atgtccactc 300
 acccgctcagt ctataaatac ttagccctc cctcattgtt aaggagagca aatctcagag 360
 agatagtcct agagagagaa agagagcaag tagcctagaa gtagtcaagg cggcgaagta 420
 ttcaggcagg gtggccagga agaagaaaag ccaagacgac gaaaacaggt aagagctaag 480
 ctttctcatc tcaaagatga ttcttgatga tttttgtctc cacggtccgt ataggatcca 540
 ctgaattgat aaatatcata tggtttgat aaaacccgat atttaaatct gtatcattct 600
 gtttgaataa aacttgatac tttgttgag tcgtttgtaa aaacataaac aattataatc 660
 tgtaaaaaac 670

<210> 2
 <211> 346
 <212> ДНК
 <213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 2
 ctggcagaca aagtggcaga catactgtcc cacaaatgaa gatggaatct gtaaaagaaa 60
 acgctgaaa taatgcgtct gacaaagggt aggtcggctg cctttaatca ataccaaagt 120
 ggtccctacc acgatgaaa aactgtgcag tcggtttggc tttttctgac gaacaaataa 180
 gattcgtggc cgacagggtg gggccacca tgtgaaggca tcttcagact ccaataatgg 240
 agcaatgacg taagggtta cgaataaagt aagggtagtt tgggaaatgt ccaatcacc 300
 gtcagtctat aaatacttag ccctccctc attgttaagg gagcaa 346

<210> 3

<211> 400

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 3

```
ctggcagaca aagtggcaga catactgtcc cacaaatgaa gatggaatct gtaaaagaaa 60
acgcgtgaaa taatgcgtct gacaaagggtt aggtcggctg cctttaatca ataccaaagt 120
ggtccttacc acgatggaaa aactgtgcag tcggtttggc tttttctgac gaacaaataa 180
gattcgtggc cgacagggtg ggggtccacca tgtgaaggca tcttcagact ccaataatgg 240
agcaatgacg taagggttta cgaaataagt aagggtagtt tgggaaatgt ccaactaccc 300
gtcagtcctat aaatacttag cccctccctc attgttaagg gagcaaaatc tcagagagat 360
agtcctagag agagaaagag agcaagtagc ctagaagtag 400
```

<210> 4

<211> 634

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 4

```
ctggcagaca aagtggcaga catactgtcc cacaaatgaa gatggaatct gtaaaagaaa 60
acgcgtgaaa taatgcgtct gacaaagggtt aggtcggctg cctttaatca ataccaaagt 120
ggtccttacc acgatggaaa aactgtgcag tcggtttggc tttttctgac gaacaaataa 180
gattcgtggc cgacagggtg ggggtccacca tgtgaaggca tcttcagact ccaataatgg 240
agcaatgacg taagggttta cgaaataagt aagggtagtt tgggaaatgt ccaactaccc 300
gtcagtcctat aaatacttag cccctccctc attgttaagg gagcaaaatc tcagagagat 360
agtcctagag agagaaagag agcaagtagc ctagaagtag tcaaggcggc gaagtattca 420
ggcaggggtg ccaggaagaa gaaaagccaa gacgacgaaa acaggtaaga gctaagcttt 480
ctcatctcaa agatgattct tgatgatttt tgtctccacg gtccgtatag gatccactga 540
attgataaat atcatatggg ttgtataaaa cccgatattt aaatctgtat cattctgttt 600
gaataaaact tgatactttg ttggagtcgt ttgt 634
```

<210> 5

<211> 32

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 5

```
aaaaacataa acaattataa tctgttaaaa ac 32
```

<210> 6

<211> 104

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 6

```
ggcacagctg tcagttgtgc aaatccgagt catctggacc acaaacatca gaagagggtc 60
tacaagagtc agaagacgaa gacttttcgg tgctagttta atta 104
```

<210> 7

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 7

gaccasaaac atcagaag

18

<210> 8

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 8

caaaacttatt gggtaatc

18

<210> 9

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 9

cagggtacca ctaaaatcac c

21

<210> 10

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 10

aggggatccc caattcccc

19

<210> 11

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 11

aggggtacca tcgatatgga g

21

<210> 12

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:
олігонуклеотид
<400> 12
ttaggatccg ccctgccc 19
<210> 13
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:
олігонуклеотид
<400> 13
cttctagaca aagtggcaga c 21
<210> 14
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:
олігонуклеотид
<400> 14
ttggtacctt aacaatgagg g 21
<210> 15
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:
олігонуклеотид
<400> 15
ctacttctag gtaccttgct c 21
<210> 16
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:
олігонуклеотид
<400> 16
ttggtacctt aacaatgagg g 21
<210> 17
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 17

ggggatcccc agtctctctc

20

<210> 18

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 18

gtgaattcga gctcggta

18

<210> 19

<211> 668

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 19

attactggca gacaaagtgg cagacatact gtcccacaaa tgaagatgga atctgtaaaa 60
 gaaaacgcgt gaaataatgc gtctgacaaa ggtaggtcg gctgccttta atcaatacca 120
 aagtgggtccc taccacgatg gaaaaactgt gcagtcgggt tggctttttc tgacgaacaa 180
 ataagattcg tggccgacag gtgggggtcc accatgtgaa ggcatcttca gactccaata 240
 atggagcaat gacgtaaggg cttacgaaat aagtaagggt agtttgaggaa atgtccactc 300
 acccgtcagt ctataaatac ttagccctc cctcattgtt aaggagcaa aatctcagag 360
 agatagtctt agagagagaa agagagcaag tagcctagaa gtagtcaagg cggcgaagta 420
 ttcaggcagg tggccaggaa gaagaaaagc caagacgacg aaaacaggta agagctaagc 480
 tttctcatct caaagatgat tcttgatgat ttttgtctcc acgggtccgta taggatcact 540
 gaattgataa atatcatatg gtttgataaa aaccgatat ttaaactctgt atcattctgt 600
 ttgaataaaa cttgatactt tgttgagtc gtttgataaa acataaacia ttataatctg 660
 ttaaaaac 668

<210> 20

<211> 632

<212> ДНК

<213> Вірус жовтого скручування листя цестрових

<400> 20

ctggcagaca aagtggcaga catactgtcc cacaaatgaa gatggaatct gtaaaagaaa 60
 acgcgtgaaa taatgcgtct gacaaagggt aggtcggctg cctttaatca ataccaaagt 120
 ggtccctacc acgatggaaa aactgtgcag tcggtttggc tttttctgac gaacaaataa 180
 gattcgtggc cgacaggtgg ggggccacca tgtgaaggca tcttcagact ccaataatgg 240
 agcaatgacg taagggtcta cgaataaagt aagggtagtt tgggaaatgt ccaactcccc 300
 gtcagtctat aaatacttag ccctccctc attgttaagg gagcaaaatc tcagagagat 360
 agtcctagag agagaagag agcaagtagc ctagaagtag tcaaggcggc gaagtattca 420
 ggcagggtggc caggaagaag aaaagccaag acgacgaaa caggtaagag ctaagctttc 480
 tcatctcaaa gatgattctt gatgattttt gtctccacgg tccgtatagg atcactgaat 540

tgataaatat catatgggtt gtataaaacc cgatatttaa atctgtatca ttctgtttga 600
ataaaaacttg atactttgtt ggagtcgttt gt 632

<210> 21

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 21

cccgctgcag atcggtcaaa catttggc 28

<210> 22

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 22

cccgaagctt tctagagatc tagtaac 27

<210> 23

<211> 41

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 23

ggcggatcc gcatgcatgt cttaaggtaa gctcactaag g 41

<210> 24

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 24

ccgcgctgca ggctgctttc aagcaagttc tgcg 34

<210> 25

<211> 35

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 25
 ttgagagctc gtttaattac tggcagacaa agtgg 35
 <210> 26
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності:
 олігонуклеотид
 <400> 26
 ttgactgcag gtttatgttt ttacaaacga ctcc 34
 <210> 27
 <211> 137
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: сайт множинного
 клонування AGLINK
 <400> 27
 gcggccgctc cggattcgaa ttaattaacg tacgaagctt gcatgcctgc agtgatcacc 60
 atggctgact ctagaggatc cccgggtacc gagctcgaat tcggcgcgcc caattgattt 120
 aaatggccgc tgcggcc 137
 <210> 28
 <211> 216
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: сайт множинного
 клонування BIGLINK
 <400> 28
 ggccgcagcg gccatttaaa tcaattgggc gcgcgaatt cgagctcggg acccggggat 60
 cctctagagt cgaccatggg gatcactgca ggcatgcaag cttcgtacgt taattaattc 120
 gaatccggag cggccgcacg cgtgggccc tttaaacctc gagagatctg ctagccctgc 180
 aggaatttta ccggtgccc ggccggccagc atggcc 216
 <210> 29
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності:
 олігонуклеотид
 <400> 29
 cgcggatcct ggcagacaaa gtggcaga 28
 <210> 30
 <211> 26
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 30

cgcggtaccc acttctaggg tacttg

26

<210> 31

<211> 7195

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

вектор pNOV2804

<400> 31

gtttacccgc caatatatcc tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac 60
aatctgatca tgagcggaga attaaggagg tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg 120
acaagccgtt ttacgtttgg aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg 180
gccatttaaa tcaattgggc gcgtacgtag cactagtgcg cgatcgctta attaagcggc 240
gcgcctaaag cttgcatgcc tgcaggctga ctctagagga tccccgatca tgcaaaaact 300
cattaactca gtgcaaaaact atgcctgggg cagcaaaaac gcgttgactg aactttatgg 360
tatggaaaat ccgtccagcc agccgatggc cgagctgtgg atgggcgcac atccgaaaag 420
cagttcacga gtgcagaatg ccgcccggaga tatcgtttca ctgcgtgatg tgattgagag 480
tgataaatcg actctgctcg gagaggccgt tgccaaacgc tttggcgaac tgcctttcct 540
gttcaaagta ttatgcccag cacagccact ctccattcag gtccatccaa acaaacacaa 600
ttctgaaatc ggttttgcca aagaaaatgc cgcaggtatc ccgatggatg ccgccgagcg 660
taactataaa gatcctaacc acaagccgga gctggttttt gcgctgacgc ctttccttgc 720
gatgaacgcg tttcgtgaat ttcccgagat tgtctcccta ctccagccgg tcgcagggtgc 780
acatccggcg attgctcact ttttacaaca gcctgatgcc gaacgtttta gcgaactgtt 840
cgccagcctg ttgaatatgc aggggtgaaga aaaatccgcg gcgctggcga ttttaaaatc 900
ggccctcgat agccagcagg gtgaaccgtg gcaaaccgatt cgtttaattt ctgaatttta 960
cccggaaagac agcgggtctgt tctccccgct attgctgaat gtgggtgaaat tgaaccctgg 1020
cgaagcgatg ttcctgttcg ctgaaacacc gcacgcttac ctgcaaggcg tggcgctgga 1080
agtgatggca aactccgata acgtgctgcg tgcgggtctg acgcctaaat acattgatat 1140
tccggaactg gttgccaatg tgaaattcga agccaaacgg gctaaccagt tgttgaccca 1200
gccggtgaaa caagggtgcag aactggactt cccgattcca gtggatgatt ttgccttctc 1260
gctgcatgac cttagtataa aagaaaccac cattagccag cagagtgcgg ccattttgtt 1320
ctgcgtcgaa ggcgatgcaa cgttgtggaa aggttctcag cagttacagc ttaaaccggg 1380
tgaatcagcg tttattgccg ccaacgaatc accgggtgact gtcaaaggcc acggccgttt 1440
agcgcgtgtt tacaacaagc tgtaagagct tactgaaaaa attaacatct cttgctaagc 1500
tgggagctct agatccccga atttccccga tcgttcaaac atttggaat aaagtttctt 1560
aagattgaat cctgttgccg gtcttgcatg gattatcata taatttctgt tgaattacgt 1620
taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat 1680
tagagtcccg caattatata tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta 1740
ggataaatta tcgcgcgcgg tgatcatctat gttactagat cgggaatttg gtaccatgcc 1800
cgggcggcca gcatggccgt atccgcaatg tgttattaag ttgtctaagc gtcaatttgt 1860
ttacaccaca atatatcctg ccaccagcca gccaacagct ccccgaccgg cagctcggca 1920

caaaatcacc actcgatata ggcagcccat cagaattaat tctcatgttt gacagcttat 1980
 catcgactgc acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca gccatcggaa gctgtggtat 2040
 ggctgtgcag gtcgtaaatc actgcataat tctgttcgct caaggcgacac tcccgttctg 2100
 gataatgttt tttgcgccga catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctgtt 2160
 gacaattaat catccggctc gtataatgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac 2220
 aggaaacaga ccatgaggga agcgttgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta 2280
 gttggcgctca tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc 2340
 gcagtggatg gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta 2400
 aggcttgatg aaacaacgcy gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaac ttcggcttcc 2460
 cctggagaga gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc 2520
 attccgtggc gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac 2580
 attccttcag gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat ctgtctgaca 2640
 aaagcaagag aacatagcgt tgcttggta ggtccagcgg cggaggaaact ctttgatccg 2700
 gttcctgaac aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg 2760
 cccgactggg ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcat ttggtacagc 2820
 gcagtaaccg gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgctg 2880
 ccggcccagc atcagcccgt catacttgaa gctaggcagg cttatcttg acaagaagat 2940
 cgcttggcct cgcgcgacga tcagttggaa gaatttgttc actacgtgaa aggcgagatc 3000
 accaaagtag tcggcaaata aagctctagt ggatctccgt acccccggg gatctggctc 3060
 gcggcggacg cagcagccg gggcgagacc ataggcgatc tcctaaatca atagtagctg 3120
 taacctcgaa gcgtttcact tgtaacaacg attgagaatt tttgtcataa aattgaaata 3180
 cttggttcgc atttttgtca tccgcggtca gccgcaattc tgacgaactg cccatttagc 3240
 tggagatgat tgtacatcct tcacgtgaaa atttctcaag cgctgtgaac aagggttcag 3300
 attttagatt gaaaggtgag ccgttgaaac acgttcttct tgtcgatgac gacgtcgcta 3360
 tgccgcatct tattattgaa taccttacga tccacgcctt caaagtgacc gcggtagccg 3420
 acagcaccga gttcacaga gtactctctt ccgcgacggt cgatgtcgtg gttgttgatc 3480
 taaatttagg tcgtgaagat gggctcgaga tcgttcgtaa tctggcggca aagtctgata 3540
 ttccaatcat aattatcagt ggcgaccgcc ttgaggagac ggataaagtt gttgcactcg 3600
 agctaggagc aagtgatatt atcgctaagc cgttcagtat cagagagttt ctacgacgca 3660
 ttccgggttc cttgcgcgtg gcgcccaacg ttgtccgctc caaagaccga cggctctttt 3720
 gttttactga ctggacactt aatctcaggc aacgtcgctt gatgtccgaa gctggcggtg 3780
 aggtgaaact tacggcaggc gagttcaatc ttctcctcgc gtttttagag aaaccccgcg 3840
 acgttctatc gcgcgagcaa cttctcattg ccagtcgagt acgcgacgag gaggtttatg 3900
 acaggagtat agatgttctc attttgaggc tgccgcgcaa acttgaggca gatccgtcaa 3960
 gccctcaact gataaaaaca gcaagaggtg ccggttattt ctttgacgcy gacgtgcagg 4020
 tttcgacgcy ggggacgatg gcagcctgag ccaattccca gatccccgag gaatcggcgt 4080
 gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcy gcgctgggtg atgacctggt 4140
 ggagaagttg aaggccgcyg aggcgcgcca gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc 4200
 cgggtgaatc tggcaagcgy ccgctgatc aatccgcaaa gaatcccggc aaccgcccgc 4260
 agccggtgcy ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac gagcaaccag attttttctg 4320
 tccgatgctc tatgacgtgg gcaaccgcyg tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt 4380
 ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgy 4440
 gcacgtagag gtttcgcgag ggccggccgy catggccagt gtgtgggatt acgacctggt 4500
 actgatggcy gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga 4560
 caagcccgcy cgctgttctc gtccacacgt tgccgacgta ctcaagttct gccggcgagc 4620
 cgatggcgga aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc attcggttaa acaccacgca 4680


```

cgttgccatg cagcgctacga agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg 4740
tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa accgggcccgc cggagtacat 4800
cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccgagcgt 4860
gctgacgggt caccocgatt actttttgat cgatcccggc atcggccggt ttctctaccg 4920
cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga 4980
acgcagtggc agcgccggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg 5040
gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct 5100
agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga 5160
gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg gaaaaaaggc cgaagagtc tctttcctgt 5220
ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg 5280
gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa 5340
aaaaggcgat ttttcgcctt aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaaccgcct 5400
ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgctaccct 5460
tcggtcgctg cgctccctac gcccgcgcgc ttccgctcgg cctatcgcg cgcgtggccg 5520
ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg cgcggacaag ccgcgccgtc 5580
gccactcgac cgccggcgct gaggtctgcc tcgtgaagaa ggtgttgctg actcatacca 5640
ggcctgaatc gcccctcatc ccagccagaa agtgaggagg ccacgggtga tgagagcttt 5700
gttgtagggt gaccagtggg tgattttgaa cttttgcttt gccacggaac ggtctgcgtt 5760
gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa ctacgcaaaa gttcgattta ttcaacaaag 5820
ccgcgcctcc gtcaagtcat cgtaatgctc tgccagtgtt acaaccaatt aaccaattct 5880
gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca 5940
ataccatatt tttgaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc 6000
cataggatgg caagatcctg gtatcgggtc gcgattccga ctcgccaac atcaatacaa 6060
cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgcg 6120
actgaatccg gtgagaatgg caaaagctct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag 6180
aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgcg ttccctcgctc actgactcgc tgcgctcgg 6240
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 6300
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 6360
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 6420
aatcgacgc tcaagtcatg ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt 6480
tccccttgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta ccggatacct 6540
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 6600
cagttcgggt taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 6660
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt 6720
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtg 6780
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 6840
ctgcgctcgt ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 6900
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 6960
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 7020
aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 7080
tttgatccgg aattaattcc tgtggttggc atgcacatac aaatggacga acggataaac 7140
cttttcacgc ctttttaaat atccgattat tctaataaac gctcttttct cttag 7195

```

<210> 32

<211> 4224

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

вектор pNOV3604

<400> 32

```

agcttgcatg cctgcaggtc gactctagag gatccccgat catgcaaaaa ctcattaact 60
cagtgcacaaa ctatgcctgg ggcagcaaaa cggcgttgac tgaactttat ggtaggaaa 120
atccgtccag ccagccgatg gccgagctgt ggatgggcgc acatccgaaa agcagttcac 180
gagtgcagaa tgccgcgga gatatacttt cactgcgtga tgtgattgag agtgataaat 240
cgactctgct cgagagaggc gttgccaaac gctttggcga actgcctttc ctgttcaaag 300
tattatgcgc agcacagcca ctctccattc aggttcatcc aaacaaacac aattctgaaa 360
tcggttttgc caaagaaaat gccgcaggta tcccgatgga tgccgcgag cgtaactata 420
aagatcctaa ccacaagccg gagctggttt ttgcgctgac gcctttcctt gcgatgaacg 480
cgtttcgtga attttccgag attgtctccc tactccagcc ggtagcagggt gcacatccgg 540
cgattgctca ctttttcaaa cagcctgatg ccgaacgttt aagcgaactg ttcgccagcc 600
tgttgaatat gcagggtgaa gaaaaatccc gcgcgctggc gatttttaaa tcggccctcg 660
atagccagca ggggtgaaccg tggcaaacga ttctgttaat ttctgaattt taccgcgaag 720
acagcggctc gttctccccg ctattgctga atgtggtgaa attgaaccct gccgaagcga 780
tgttctgtgt cgctgaaaca ccgcacgctt acctgcaagg cgtggcgctg gaagtgatgg 840
caaactccga taacgtgctg cgtgcgggtc tgacgcctaa atacattgat attccggaac 900
tggttgccaa tgtgaaattc gaagccaaac cggctaacca gttgttgacc cagccggtga 960
aacaagggtc agaactggac ttcccgatcc cagtggatga ttttgccttc tcgctgcatg 1020
accttagtga taaagaaaac accattagcc agcagagtgc cgccattttg ttctgcgtcg 1080
aaggcgatgc aacgttggtg aaagggttctc agcagttaca gcttaaaccg ggtgaatcag 1140
cgtttattgc cgccaacgaa tcaccggtga ctgtcaaagg ccacggccgt ttagcgcgtg 1200
tttacaacaa gctgtaagag cttactgaaa aaattaacat ctcttgctaa gctgggagct 1260
ctagatcccc gaatttcccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga 1320
atcctgttgc cggctcttgc atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg 1380
taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc 1440
cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat 1500
tatcgcgctg ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt gggtagcgaa ttcactggcc 1560
gtcggtttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgcta cccaacttaa tcgccttgca 1620
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga tcgcccttcc 1680
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat 1740
ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 1800
tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 1860
ctcccgcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 1920
ttttcacctg catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta 1980
taggttaatg tcatgataat aatgggttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaa 2040
gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 2100
agacaataac cctgataaat gtttcaatgg cgcgcgcggc ccgcttaaga atattgaaa 2160
aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tcgggcattt 2220
tgccctctctg tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 2280
ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt 2340
tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg 2400
gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 2460
aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 2520

```

agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg 2580
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 2640
 actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 2700
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 2760
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 2820
 cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 2880
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 2940
 gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag 3000
 ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 3060
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 3120
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccctgta 3180
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 3240
 acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 3300
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 3360
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 3420
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 3480
 agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag 3540
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 3600
 agcgccacgc ttcccgaagg gaaaaaggcg gacaggatc cggtaagcgg cagggtcggg 3660
 acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 3720
 ggggttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gtcgctcagg ggggcggagc 3780
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 3840
 gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 3900
 gagtgtgctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtgac agtgagcgtg 3960
 gaagcgggaag agcttaagcg gccgcggcgc gccgccaat acgcaaaccg cctctccccg 4020
 cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacagggt tcccactgg aaagcgggca 4080
 gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcaactatta ggcaccccag gcttttacct 4140
 ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa 4200
 acagctatga ccatgattac gccca 4224

<210> 33

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 33

ccatcgtggt atttgggtatt g

21

<210> 34

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

олігонуклеотид

<400> 34

71	86341	72
caataccaaa taccacgatg g		21
<210> 35		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:		
олігонуклеотид		
<400> 35		
cgtggttagcg agcacttttg t		21
<210> 36		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності:		
олігонуклеотид		
<400> 36		
aagtgctcgc taccacgatg g		21
<210> 37		
<211> 912		
<212> ДНК		
<213> Штучна		
<220>		
<223> Штучна послідовність синтетичного гена GFP, яка містить інтрон		
<400> 37		
atgagcaagg gcgaggagct gttcacccggc gtggtgccaa tcctgggtgga gctggacggc	60	
gacgtgaacg gccacaagtt cagcgtgagc ggcgagggcg agggcgacgc gacctacggc	120	
aagctgaccc tgaagttcat ctgtaccacc ggcaagctcc cgggtcccgtg gccgaccctg	180	
gtgaccacct tcacctacgg cgtgcagtgt ttcagccgct acccggaacca catgaagcgc	240	
cacgacttct tcaagagcgc catgccggag ggctacgtaa gtttctgctt ctacctttga	300	
tatatatata ataattatca ttaattagta gtaatatata atttcaaata tttttttcaa	360	
aataaaagaa tgtagtatat agcaattgct tttctgtagt ttataagtgt gtatatttta	420	
atttataact tttctaatat atgacaaaaa tttgttgatg tgcaggtgca ggagcgcacc	480	
atcagcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac	540	
acactagtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg	600	
ggccacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtgt acatcacccg ggacaagcag	660	
aagaacggca tcaaggcgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag	720	
ctggccgacc actaccagca gaacaccccg atcggcgacg gtcctgtgct gctgccggac	780	
aaccactacc tgagcaccca gagcgccctg agcaaggacc cgaacgagaa gcgcgaccac	840	
atggtgctgc tggagttcgt gaccgccgcc ggcacaccc acggcatgga cgagctgtac	900	
aaggtttaact ag	912	
<210> 38		
<211> 2001		
<212> ДНК		

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність гена GUS, яка містить інтрон

<400> 38

```
atggtccgtc ctgtagaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagttctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgctgcg ttctgatgcg gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360
tatgttattg ccgggaaaaag tgtacgtaag tttctgcttc tacctttgat atatatataa 420
taattatcat taattagtag taatataata tttcaaatat ttttttcaaa ataaaagaat 480
```

```
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttaa ttataactt 540
ttctaataata tgacaaaaat ttgttgatgt gcagggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
cagtcttact tccatgattt cttaactat gccggaatcc atcgacgct aatgctctac 720
accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtgggtga cgcattgctc gcaagactgt 780
aaccacgctg ctgttgactg gcagggtgtg gccaatgggt atgtcagcgt tgaactgctg 840
gatgcggatc aacagggtgt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggtg 900
aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaagg tatctctatg aactgtgctg cacagccaaa 960
agccagacag agtgtgatat ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
ggcgaacagt tcctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggcttttg tcgtcatgaa 1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 1140
atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgcat acccttacgc tgaagagatg 1200
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgcggtctt 1260
aacctctctt taggcattgg ttctgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
cgtgacaaaa accacccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
ccgcaagggt cacgggaata ttctcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccgg 1500
acgcgtccga tcacctgctg caatgtaatg ttctgcgacg ctacacaccg taccatcagc 1560
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
ttggaaacgg cagagaagggt actggaaaaa gaacttcttg cctggcagga gaaactgcat 1680
cagccgatta tcataccgga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtggt gatggctggt atatgtatca ccgcgtcttt 1800
gatcgcgctc gcgccgctgt cgggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tctctcgca ccgcaaacgg 1920
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaacgg 1980
cagcagggag gcaaacaaatg a 2001
```

<210> 39

<211> 26

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність праймера для PCR

<400> 39

cgcggattgc tcccttaaca atgagg 26
 <210> 40
 <211> 1618
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучна послідовність касети експресії CmpS-synGFPI-nos
 <400> 40
 tcctggcaga caaagtggca gacatactgt cccacaaatg aagatggaat ctgtaaaaga 60
 aaacgcgtga aataatgcgt ctgacaaagg ttaggtcggc tgcctttaat caataccaaa 120
 gtggtcccta ccacgatgga aaaactgtgc agtcggtttg gctttttctg acgaacaaat 180
 aagattcgtg gccgacaggt gggggtccac catgtgaagg catcttcaga ctccaataat 240
 ggagcaatga cgtaagggct tacgaaataa gtaagggtag tttgggaaat gtccactcac 300
 ccgtcagtct ataaatactt agcccctccc tcattgttaa gggagcaaaa tctcagagag 360
 atagtccctag agagagaaag agagcaagta gcctagaagt aggatccacc atgctgcaga 420
 tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccggcg tggtgccaat cctggtggag ctggacggcg 480
 acgtgaacgg ccacaagttc agcgtgagcg gcgaggcgga gggcgacgag acctacggca 540
 agctgaccct gaagttcatc tgtaccaccg gcaagctccc ggtcccgtag ccgaccctgg 600
 tgaccacctt cactacggcg gtgcagtgtt tcagccgcta cccggaccac atgaagcgcc 660
 acgacttctt caagagcgcc atgccggagg gctacgtaag tttctgcttc tacctttgat 720
 atatatataa taattatcat taattagtag taatataata tttcaaatat ttttttcaaa 780
 ataaaagaat gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttaa 840
 tttataactt ttctaataa tgaccaaagt ttgttgatgt gcagggtgag gagcgaccca 900
 tcagcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca 960
 cactagttaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg 1020
 gccacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtgta catcaccgag gacaagcaga 1080
 agaacggcat caaggcgaa ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc 1140
 tggccgacca ctaccagcag aacaccccga tcggcgacgg tcctgtgctg ctgccggaca 1200
 accactacct gagcaccag agcgcctga gcaaggaccc gaacgagaag cgcgaccaca 1260
 tgggtgctgct ggagtctgtg accgcgcgag gcatcaccga cggcatggac gagctgtaca 1320
 aggttaacta gagctcaaga tccccgaat tccccgatc gttcaaacat ttggcaataa 1380
 agtttcttaa gattgaatcc tggtgcccgt cttgcgatga ttatcatcta atttctgttg 1440
 aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatattat gagatgggtt 1500
 tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgaga tagaaaacaa aatatagcgc 1560
 gcaaaactagg ataaattatc gcgcgcgggt tcatctatgt tactagatcc gggaattg 1618
 <210> 41
 <211> 2730
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучна послідовність касети експресії CmpS-GIG-nos
 <400> 41
 aggatcctgg sagacaaagt ggcagacata ctgtcccaca aatgaagatg gaatctgtaa 60

aagaaaacgc	gtgaaataat	gcgtctgaca	aaggtaggt	cggctgcctt	taatcaatac	120
caaagtggtc	cctaccacga	tggaaaaact	gtgcagtcgg	tttggctttt	tctgacgaac	180
aaataagatt	cgtggccgac	aggtgggggt	ccaccatgtg	aaggcatctt	cagactccaa	240
taatggagca	atgacgtaag	ggcttacgaa	ataagtaagg	gtagtttggg	aaatgtccac	300
tcacccgtca	gtctataaat	acttagcccc	tccctcattg	ttaagggagc	aaaatctcag	360
agagatagtc	ctagagagag	aaagagagca	agtagcctag	aagtaggatac	ccctcgagggt	420
cgaccatggg	ccgtcctgta	gaaaccccaa	cccgtgaaat	caaaaaactc	gacggcctgt	480
gggcattcag	tctggatcgc	gaaaactgtg	gaattgatca	gcgttggtgg	gaaagcgctg	540
tacaagaaag	ccgggcaatt	gctgtgccag	gcagttttta	cgatcagttc	gccgatgcag	600
atattcgtaa	ttatgcgggc	aacgtctggg	atcagcgcca	agtcctttata	ccgaaagggt	660
gggcaggcca	gcgtatcgtg	ctgcgtttcg	atgcggtcac	tcattacggc	aaagtgtggg	720
tcaataatca	ggaagtgatg	gagcatcagg	gcggctatac	gccatttgaa	gccgatgtca	780
cgccgtatgt	tattgccggg	aaaagtgtac	gtaagtttct	gcttctacct	ttgatataata	840
tataataatt	atcattaatt	agtagtaata	taatatttca	aatatttttt	tcaaaataaa	900
gaatgtagt	atatagcaat	tgcttttctg	tagtttataa	gtgtgtatat	tttaatttat	960
aacttttcta	atatatgacc	aaaatttggt	gatgtgcagg	tatcaccggt	tgtgtgaaca	1020
acgaactgaa	ctggcagact	atcccgcggg	gaatgggtgat	taccgacgaa	aacggcaaga	1080
aaaagcagtc	ttacttccat	gatttcttta	actatgccgg	aatccatcgc	agcgtaatgc	1140
tctacaccac	gccgaacacc	tgggtggacg	atatcaccgt	ggtgacgcat	gtcgcgcaag	1200
actgtaacca	cgcgtctggt	gactggcagg	tgggtggcaa	tgggtgatgtc	agcgttgaac	1260
tgcgtgatgc	ggatcaacag	gtggttgcaa	ctggacaagg	cactagcggg	actttgcaag	1320
tgggtgaatcc	gcacctctgg	caaccgggtg	aagggttatct	ctatgaactg	tgcgtcacag	1380
ccaaaagcca	gacagagtgt	gatatctacc	cgttctcgct	cggcatccgg	tcagtggcag	1440
tgaaggcgga	acagttcctg	attaaccaca	aaccgttcta	ctttactggc	tttggctcgtc	1500
atgaagatgc	ggacttgcgt	ggcaaaggat	tcgataacgt	gctgatgggtg	cacgaccacg	1560
cattaatgga	ctggattggg	gccaaactcct	accgtacctc	gcattaccct	tacgtggaag	1620
agatgctcga	ctgggcagat	gaacatggca	tcgtgggtgat	tgatgaaact	gctgtgtcgtc	1680
gctttaacct	ctcttttaggc	attgggttcg	aagcgggcaa	caagccgaaa	gaactgtaca	1740
gcgaagaggc	agtcaacggg	gaaactcagc	aagcgcactt	acaggcgatt	aaagagctga	1800
tagcgcgtga	caaaaaccac	ccaagcgtgg	tgatgtggag	tattgccaac	gaaccggata	1860
cccgctccga	aggtgcacgg	gaatatttctg	cgccactggc	ggaagcaacg	cgtaaactcg	1920
accgcagcgc	tccgatcacc	tgcgtcaatg	taatgttctg	cgacgctcac	accgatacca	1980
tcagcgcgtc	ctttgatgtg	ctgtgcctga	accgttatta	cggatgggtat	gtccaaagcg	2040
cgatttgga	aacggcagag	aaggtagtgg	aaaaagaact	tctggcctgg	caggagaaac	2100
tgcacagacc	gattatcatc	accgaatacg	gcgtggatac	gttagccggg	ctgcactcaa	2160
tgtacaccga	catgtggagt	gaagagtatc	agtggtcatg	gctggatatg	tatcaccgcg	2220
tctttgatcg	cgtcagcgcc	gtcgtcgggtg	aacaggtatg	gaatttcgcc	gattttgcga	2280
cctcgcaagg	catattgcgc	gttggcggta	acaagaaagg	gatcttcaact	cgcgaccgca	2340
aaccgaagtc	ggcggctttt	ctgctgcaaa	aacgctggac	tggcatgaac	ttcggtgaaa	2400
aaccgcagca	gggaggcaaa	caatgaatca	acaactctcc	tggcgacca	tcgtcggcta	2460
cagcctcggg	aattagatcc	ccgaatttcc	ccgatcgctc	aaacatttgg	caataaagtt	2520
tcttaagatt	gaatcctggt	gccggtcttg	cgatgattat	catataatct	ctgttggaatt	2580
acgttaagca	tgtaataatt	aacatgtaat	gcatagcgtt	atcttatgaga	tgggttttta	2640
tgattagagt	cccgaatta	tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	2700
actaggataa	attatcgccg	gcgggtgcat				2730

<210> 42

<211> 1577

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність касети експресії CmpC-synGFPI-nos

<400> 42

```

tggcagacaa agtggcagac atactgtccc acaaatgaag atggaatctg taaaagaaaa      60
cgcgtgaaat aatgcgtctg acaaagggtta ggtcggctgc ctttaatcaa taccaaagtg    120
gtccctacca cgatggaaaa actgtgcagt cggtttggct ttttctgacg aacaaataag    180
attcgtggcc gacaggtggg ggtccaccat gtgaaggcat cttcagactc caataatgga    240
gcaatgacgt aagggtttac gaaataagta agggtagttt gggaaatgtc cactcaccgc    300
tcagtctata aatacttagc ccctccctca ttgttaaggg agcaacgacg cgcgaagggc    360
gaattcgttt aaacctgcag atgagcaagg gcgaggagct gttcaccggc gtggtgccaa    420
tcctggtgga gctggacggc gacgtgaacg gccacaagtt cagcgtgagc ggcgagggcg    480
agggcgacgc gacctacggc aagctgaccc tgaagttcat ctgtaccacc ggcaagctcc    540
cgggtcccggtg gccgaccctg gtgaccacct tcacctacgg cgtgcagtgt ttcagccgct    600
acccggacca catgaagcgc cactgacttct tcaagagcgc catgccggag ggctacgtaa    660
gtttctgctt ctacctttga tatatatata ataattatca ttaattagta gtaataaat      720
atttcaaata tttttttcaa aataaaagaa tgtagtatat agcaattgct tttctgtagt    780
ttataagtggt gtatatttta atttataact tttctaatat atgacaaaaa tttgttgatg    840
tgcaggtgca ggagcgcacc atcagcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg    900
aggtgaagtt cgagggcgac acactagtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca    960
aggaggacgg caacatcctg ggccacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaatgtgt   1020
acatcaccgc ggacaagcag aagaacggca tcaaggcgaa cttcaagatc cgccacaata   1080
tcgaggacgg cagcgtgcag ctggccgacc actaccagca gaacaccccg atcggcgacg   1140
gtcctgtgct gctgccggac aaccactacc tgagcaccga gagcgccctg agcaaggacc   1200
cgaacgagaa gcgcgaccac atgggtgctgc tggagtctgt gaccgcccgc ggcatcacc   1260
acggcatgga cgagctgtac aagggttaact agagctctag atccccgaat tccccgac   1320
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggg cttgcatgga   1380
ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga   1440
cgttatttat gagatggggt tttatgatta gagtcccgcg attatacatt taatacgcga   1500
tagaaaacaa aatatagcgc gcaaaactagg ataaattatc gcgcgcgggtg tcattctatgt   1560
tactagatcg ggaattg                                     1577

```

<210> 43

<211> 2725

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність касети експресії CmpC-GIG-nos

<400> 43

```

tggcagacaa agtggcagac atactgtccc acaaatgaag atggaatctg taaaagaaaa      60
cgcgtgaaat aatgcgtctg acaaagggtta ggtcggctgc ctttaatcaa taccaaagtg    120
gtccctacca cgatggaaaa actgtgcagt cggtttggct ttttctgacg aacaaataag    180
attcgtggcc gacaggtggg ggtccaccat gtgaaggcat cttcagactc caataatgga    240
gcaatgacgt aagggtttac gaaataagta agggtagttt gggaaatgtc cactcaccgc    300

```


81

86341

82

tcagtctata	aataacttagc	ccctccctca	ttgttaaggg	agcaacgatc	cgcgaaagggc	360
gaatttcctgc	agcccggggg	atccccctga	ggtcgaccat	ggtcctgcct	gtagaaaccc	420
caaccctgtga	aatcaaaaaa	ctcgacggcc	tgtgggcatt	cagtctggat	cgcgaaaact	480
gtggaattga	tcagcgtttg	tgggaaagcg	cgttacaaga	aagccgggca	attgctgtgc	540
caggcagttt	taacgatcag	ttcgccgatg	cagatattcg	taattatgcg	ggcaacgtct	600
ggtatcagcg	cgaagtcttt	ataccgaaag	ggtgggcagg	ccagcgtatc	gtgctgcgtt	660
tcgatgcggt	cactcattac	ggcaaagtgt	gggtcaataa	tcaggaagtg	atggagcatc	720
agggcggcta	tacgccattt	gaagccgatg	tcacgccgta	tgttattgcc	gggaaaagtg	780
tacgtaagtt	tctgcttcta	cctttgatat	atatataata	attatcatta	attagtagta	840
atataatatt	tcaaatattt	ttttcaaaat	aaaagaatgt	agtatatagc	aattgctttt	900
ctgtagttta	taagtgtgta	tattttaatt	tataactttt	ctaatatatg	acaaaaattt	960
ggtgatgtgc	aggtatcacc	gtttgtgtga	acaacgaact	gaactggcag	actatcccgc	1020
cgggaatggt	gattaccgac	gaaaacggca	agaaaaagca	gtcttacttc	catgatttct	1080
ttaaactatgc	cggaatccat	cgacgcgtaa	tgtcttacac	cacgccgaac	acctgggtgg	1140
acgatatcac	cgtggtgacg	catgtcgcgc	aagactgtaa	ccacgcgtct	gttgactggc	1200
aggtggtggc	caatggtgat	gtcagcgttg	aactgcgtga	tgcggatcaa	caggtggttg	1260
caactggaca	aggcactagc	gggaactttgc	aagtggtgaa	tccgcacctc	tggcaaccgg	1320
gtgaaggtta	tctctatgaa	ctgtgcgtca	cagccaaaag	ccagacagag	tgtgatattc	1380
acccgcttcg	cgtcggcatc	cggtcagtg	cagtgaagg	cgaacagttc	ctgattaacc	1440
acaaaccgtt	ctactttact	ggctttggtc	gtcatgaaga	tgcggacttg	cgtggcaaa	1500
gattcgataa	cgtgctgatg	gtgcacgacc	acgcattaat	ggactggatt	ggggccaact	1560
cctaccgtac	ctcgcattac	ccttacgctg	aagagatgct	cgactgggca	gatgaacatg	1620
gcatcgtggt	gattgatgaa	actgctgctg	tcggctttta	cctctcttta	ggcattgggt	1680
tcgaagcggg	caacaagccg	aaagaactgt	acagcgaaga	ggcagtcAAC	ggggaaactc	1740
agcaagcgca	cttacaggcg	attaaagagc	tgatagcgcg	tgacaaaaac	caccaagcgc	1800
tgggtgatgtg	gagtattgcc	aacgaaccgg	ataccgctcc	gcaagggtgca	cgggaatatt	1860
tcgcgccact	ggcggaagca	acgcgtaaac	tcgacccgac	gcgtccgac	acctgcgtca	1920
atgtaatggt	ctgcgacgct	cacaccgata	ccatcagcga	tctctttgat	gtgctgtgcc	1980
tgaaccgtta	ttacggatgg	tatgtccaaa	gcggcgattt	ggaaacggca	gagaaggtag	2040

tggaaaaaga	acttctggcc	tggcaggaga	aactgcac	gccgattatc	atcaccgaat	2100
tcggcggtgga	tacgttagcc	gggctgcact	caatgtacac	cgacatgtgg	agtgaagagt	2160
atcagtggtgc	atggctggat	atgtatcacc	gcgtctttga	tcgcgtcagc	gccgtcgtcg	2220
gtgaacaggt	atggaatttc	gccgattttg	cgacctcgca	aggcatattg	cgcgttgggc	2280
gtaacaagaa	agggatcttc	actcgcgacc	gcaaaccgaa	gtcggcggtc	tttctgctgc	2340
aaaaacgctg	gactggcatg	aacttcggtg	aaaaaccgca	gcaggagggc	aaacaatgaa	2400
tcaacaactc	tcctggcgca	ccatcgctcg	ctacagcctc	gggaattaga	tccccgaatt	2460
tccccgatcg	ttcaaacatt	tggcaataaa	gtttcttaag	attgaatcct	gttgccgggtc	2520
ttgcgatgat	tatcatataa	tttctgttga	attacgttaa	gcatgtaata	attaacatgt	2580
aatgcatgac	gttattttatg	agatgggttt	ttatgattag	agtcgccgaa	ttatacatatt	2640
aatacgcgat	agaaaacaaa	atatagcgcg	caaactagga	taaattatcg	cgcgcggtgt	2700
catctatggt	actagatcgg	gaatt				2725

<210> 44

<211> 9172

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність вектора pNOV2117

<400> 44

aagcttggcg	cgccgggtacc	agcttgcattg	cctgcagtg	agcgtgaccc	ggcgtgccc	60
ctctctagag	ataatgagca	ttgcatgtct	aagttataaa	aaattaccac	atattttttt	120
tgtcacactt	gtttgaagt	cagtttatct	atctttatac	atataattaa	actttactct	180
acgaataata	taatctatag	tactacaata	atatcagtg	tttagagaat	catataaatg	240
aacagttaga	catgggtctaa	aggacaattg	agtattttga	caacaggact	ctacagtttt	300
atcttttttag	tgtgcattg	ttctcctttt	tttttgcaaa	tagcttcacc	tatataatac	360
ttcatccatt	ttattagtac	atccatttag	ggtttaggg	taatggtttt	tatagactaa	420
tttttttagt	acatctattt	tattctattt	tagcctctaa	attaagaaaa	ctaaaactct	480
attttagttt	ttttatttaa	taatttagat	ataaaataga	ataaaataaa	gtgactaaaa	540
attaacaaa	taccctttta	gaaattaaaa	aaactaagga	aacatttttc	ttgtttcgag	600
tagataatgc	cagcctgtta	aacgccgtcg	acgagcttaa	cggacaccaa	ccagcgaacc	660
agcagcgtcg	cgtcggggcca	agcgaagcag	acggcacggc	atctctgtcg	ctgcctctgg	720
acccctctcg	agagttccgc	tccaccgttg	gacttgctcc	gctgtcggca	tccagaaatt	780
gcgtggcgga	gcggcagacg	tgagccggta	cggcaggcgg	cctcctctct	ctctcacggc	840
accggcagct	acgggggatt	cctttcccac	cgctccttcg	ctttcccttc	ctcggccgcc	900
gtaataaata	gacacccctt	ccacaccctc	tttcccaaac	ctcgtgttgt	tcggagcgca	960
cacacacaca	accagatctc	ccccaaatcc	accgctcggc	acctccgctt	caaggtacgc	1020
cgctcgtcct	ccccccccc	cctctcttac	ctctcttaga	tcggcggtcc	gggtccatggt	1080
tagggcccg	tagttctact	tctgttcatg	tttgtgttag	atccgtgttt	gtgttagatc	1140
cgtgctgcta	gcgttcgtac	acgatgcca	cctgtacgtc	agacacgttc	tgattgctaa	1200
cttgccagtg	ttctctttg	gggaatcctg	ggatggctct	agccgttcgc	cagacgggat	1260
gatttcatg	attttttttg	tttctgtgca	tagggtttgg	tttgcccttt	tcctttattt	1320
caatatatgc	cgtgcacttg	tttgcgggt	catcttttca	tgcttttttt	tgtcttggtt	1380
gtgatgatgt	ggtctggttg	ggcggtcgtt	ctagatcgga	gtagaattct	gtttcaaact	1440
acctggtgga	tttattaatt	ttgatctgt	atgtgtgtgc	catacatatt	catagttacg	1500
aattgaagat	gatggatgga	aatatcgatc	taggataggt	atacatgttg	atgcgggttt	1560
tactgatgca	tatacagaga	tgctttttgt	tcgcttggtt	gtgatgatgt	gggtggttg	1620
ggcggtcgtt	cattcgttct	agatcggagt	agaatactgt	ttcaaactac	ctggtgtatt	1680
tattaatttt	ggaactgtat	gtgtgtgtca	tacatcttca	tagttacgag	tttaagatgg	1740
atggaaatat	cgatctagga	taggtataca	tgttgatgtg	ggttttactg	atgcatatac	1800
atgatggcat	atgcagcatc	tattcatatg	ctctaaccct	gagtacctat	ctattataat	1860
aaacaagtat	gtttttataat	tattttgatc	ttgatatact	tgatgatgg	catatgcagc	1920
agctatatgt	ggattttttt	agccctgcct	tcatacgcta	tttatttgct	tggtactgtt	1980
tcttttgctg	atgctcacc	tggtgtttgg	tggtacttct	gcagggatcc	ccgatcatgc	2040
aaaaactcat	taactcagtg	caaaactatg	cctggggcag	caaaacggcg	ttgactgaac	2100
tttatgggat	ggaaaatccg	tccagccagc	cgtggccga	gctgtggatg	ggcgacatc	2160
cgaaaagcag	ttcacgagt	cagaatgccg	cggagatat	cgtttcactg	cgtgatgtga	2220
ttgagagtga	taaactgact	ctgctcggag	aggccgttgc	caaacgcttt	ggcgaactgc	2280
ctttcctgtt	caaagtatta	tgcgacgac	agccactctc	cattcaggtt	catccaaaca	2340
aacacaattc	tgaatcgggt	tttgccaaag	aaaatgccgc	aggtatcccg	atggatgccg	2400
ccgagcgtaa	ctataaagat	cctaaccaca	agccggagct	ggtttttgct	ctgacgcctt	2460
tccttgctgat	gaacgcgttt	cgtgaatttt	ccgagattgt	ctccctactc	cagccggtcg	2520
caggtgcaca	tccggcgatt	gctcactttt	tacaacagcc	tgatgccgaa	cgtttaagcg	2580

aactgttcgc	cagcctgttg	aatatgcagg	gtgaagaaaa	atcccgcgcg	ctggcgattt	2640
taaaatcggc	cctcgatagc	cagcaggggtg	aaccgtggca	aacgattcgt	ttaatctctg	2700
aattttaccc	ggaagacagc	ggctctgttct	ccccgctatt	gctgaatgtg	gtgaaattga	2760
accctggcga	agcgatgttc	ctgttcgctg	aaacaccgca	cgcttacctg	caaggcgtag	2820
cgctggaagt	gatggcaaac	tccgataacg	tgctgcgtgc	gggtctgacg	cctaaataca	2880
ttgatattcc	ggaactgggt	gccaatgtga	aattcgaagc	caaaccggct	aaccagttgt	2940
tgaccagcc	ggtagaaca	ggtagcagaac	tggacttccc	gattccagtg	gatgattttg	3000
ccttctcgct	gcatgacctt	agtgataaag	aaaccacat	tagccagcag	agtgcgcga	3060
ttttgttctg	cgtagaaggc	gatgcaacgt	tgtggaaagg	ttctcagcag	ttacagctta	3120
aaccgggtga	atcagcggtt	attgccgcca	acgaatcacc	ggtagctgtc	aaaggccacg	3180
gccgtttagc	gcgtgtttac	aacaagctgt	aagagcttac	tgaaaaaatt	aacatctctt	3240
gctaagctgg	gagctcgatc	cgtagacctg	cagatcgctt	aaacatttgg	caataaagtt	3300
tcttaagatt	gaatcctgtt	gccggtcttg	cgatgattat	catataattt	ctgttgaatt	3360
acgttaagca	tgtataaatt	aacatgtaat	gcatgacgtt	atttatgaga	tgggttttta	3420
tgattagagt	cccgcaatta	tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	3480
actaggataa	attatcgcg	gcggtgtcat	ctatgttact	agatctgcta	gccctgcagg	3540
aaatttaccg	gtgcccgggc	ggccagcatg	gccgtatccg	caatgtgtta	ttaagttgtc	3600
taagcgtcaa	tttgtttaca	ccacaatata	tcctgccacc	agccagccaa	cagctccccg	3660
accggcagct	cggcacaaaa	tcaccactcg	atacaggcag	cccatcagaa	ttaatctca	3720
tgtttgacag	cttatcatcg	actgcacggg	gcaccaatgc	ttctggcgct	aggcagccat	3780
cgggaagctgt	ggtagggctg	tgtaggtcgt	aaatcactgc	ataattcgtg	tcgctcaagg	3840
cgcactcccc	ttctggataa	tggtttttgc	gccgacatca	taacggttct	ggcaaatatt	3900
ctgaaatgag	ctgttgacaa	ttaatcatcc	ggctcgata	atgtgtggaa	ttgtgagcgg	3960
ataacaattt	cacacaggaa	acagaccatg	aggggaagcgt	tgatcgccga	agtatcgact	4020
caactatcag	aggtagttgg	cgtcatcgag	cgccatctcg	aaccgacgtt	gctggccgta	4080
catttgtacg	gctccgcagt	ggatggcggc	ctgaagccac	acagtgatat	tgatttgctg	4140
gttacgggtga	ccgtaaggct	tgatgaaaca	acgcggcgag	ctttgatcaa	cgaccttttg	4200
gaaacttcgg	cttccccctg	agagagcgag	attctccgcg	ctgtagaagt	caccattggt	4260
gtgcacgacg	acatcattcc	gtggcggttat	ccagctaagc	gcgaactgca	atttgagaaa	4320
tggcagcgca	atgacattct	tgtaggtatc	ttcgagccag	ccacgatcga	cattgatctg	4380
gctatcttgc	tgacaaaagc	aagagaacat	agcgttgctt	tgtaggttcc	agcggcggag	4440
gaactctttg	atccgggttc	tgaacaggat	ctatttgagg	cgctaaatga	aaccttaacg	4500
ctatggaact	cgccgcccga	ctgggctggc	gatgagcgaa	atgtagtgct	tacgttgctc	4560
cgcatttggg	acagcgcagt	aaccggcaaa	atcgcgccga	aggatgtcgc	tgccgactgg	4620
gcaatggagc	gcctgcgggc	ccagtatcag	cccgtcatac	ttgaagctag	gcaggcttat	4680
cttggaacaag	aagatcgctt	ggcctcgcg	gcagatcagt	tggaagaatt	tgctcactac	4740
gtgaaaggcg	agatcaccaa	agtagtcggc	aaataaagct	ctagtggatc	tccgtacccc	4800
cgggggatct	ggctcgcggc	ggacgcacga	cggcggggcg	agaccatagg	cgatctccta	4860
aatcaatagt	agctgtaacc	tcgaagcgtt	tcacttgtaa	caacgattga	gaatttttgt	4920
cataaaattg	aaatacttgg	ttcgcatatt	tgtcatccgc	ggtagccgcg	aattctgacg	4980
aactgcccac	ttagctggag	atgattgtac	atccttcacg	tgaaaaattc	tcaagcgctg	5040
tgaacaaggg	ttcagatttt	agattgaaag	gtgagccggt	gaaacacggt	cttcttgctg	5100
atgacgacgt	cgctatcgcg	catcttatta	ttgaatacct	tacgatccac	gccttcaaag	5160
tgaccgcggg	agccgacagc	accagttca	caagagtact	ctcttcgcgc	acggtcgatg	5220
tcgtggttgt	tgatctaaat	ttaggtcgtg	aagatgggct	cgagatcggt	cgtaatctgg	5280
cggcaaagtc	tgatattcca	atcataatta	tcagtggcga	ccgccttgag	gagacggata	5340

87			86341			88		
aagttgttgc	actcgagcta	ggagcaagtg	attttatcgc	taagccgttc	agtatcagag	5400		
agttttctagc	acgcattcgg	gttgcccttgc	gcgtgcgccc	caacgttgtc	cgctccaaag	5460		
accgacggtc	tttttgtttt	actgactgga	cacttaatct	caggcaacgt	cgcttgatgt	5520		
ccgaagctgg	cggtgaggtg	aaacttacgg	caggtgagtt	caatctttct	ctcgcgtttt	5580		
tagagaaacc	ccgcgacgtt	ctatcgcgcg	agcaacttct	cattgccagt	cgagtacgcg	5640		
acgaggaggt	ttatgacagg	agtatagatg	ttctcatttt	gaggctgcgc	cgcaaacttg	5700		
aggcagatcc	gtcaagccct	caactgataa	aaacagcaag	aggtgccggg	tatttctttg	5760		
acgcggacgt	gcaggtttcg	cacgggggga	cgatggcagc	ctgagccaat	tcccagatcc	5820		
ccgaggaatc	ggcgtgagcg	gtcgcgaaac	atccggcccc	gtacaaatcg	gcgcggcgct	5880		
gggtgatgac	ctggttgaga	agttgaaggc	cgcgcaggcc	gcccagcggc	aacgcatacga	5940		
ggcagaagca	cgccccggtg	aatcgtggca	agcggccgct	gatcgaatcc	gcaaagaatc	6000		
ccggcaaccg	ccggcagccg	gtgcgcgcgc	gattaggaag	ccgcccagg	gcgacgagca	6060		
accagatttt	ttcgttccga	tgctctatga	cgtgggcacc	cgcgatagtc	gcagcatcat	6120		
ggacgtggcc	gttttccgtc	tgtcgaagcg	tgaccgacga	gctggcgagg	tgatccgcta	6180		
cgagcttcca	gacgggcacg	tagaggtttc	cgcagggccg	gccggcatgg	ccagtgtgtg	6240		
ggattacgac	ctggtaactga	tggcggtttc	ccatctaacc	gaatccatga	accgataccg	6300		
ggaagggaag	ggagacaagc	ccggcccgct	gttccgtcca	cacgttgccg	acgtactcaa	6360		
gttctgcceg	cgagccgatg	gcggaaaagca	gaaagacgac	ctggtagaaa	cctgcattcg	6420		
gttaaacacc	acgcacgttg	ccatgcagcg	tacgaagaag	gccaagaacg	gccgcctggg	6480		
gacggtatcc	gagggtgaa	ccttgattag	ccgctacaag	atcgtaaaga	gcgaaaccgg	6540		
gcggccggag	tacatcgaga	tcgagctagc	tgattggatg	taccgcgaga	tcacagaagg	6600		
caagaacccc	gacgtgctga	cggttcaccc	cgattacttt	ttgatcgatc	ccggcatcgg	6660		
ccgttttctc	taccgcctgg	cacgcgcgcg	cgcaggcaag	gcagaagcca	gatggttggt	6720		
caagacgac	tacgaacgca	gtggcagcgc	cggagagttc	aagaagttct	gtttcacccg	6780		
gcgcaagctg	atcgggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	aggcggggca	6840		
ggctggcccc	atcctagtca	tgcgctaccg	caacctgatc	gagggcgaa	catccgccgg	6900		
ttcctaagt	acggagcaga	tgctagggca	aattgcccta	gcaggggaaa	aaggtcgaaa	6960		
aggtctcttt	cctgtggata	gcacgtacat	tgggaaccca	aagccgtaca	ttgggaaccg	7020		
gaacccgtac	attgggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggtcacaca	tgtaagtgac	7080		
tgatataaaa	gagaaaaaag	gcgatttttc	cgcctaaaac	tctttaaaac	ttattaaaac	7140		
tcttaaaaac	cgcctggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	aagagctgca	7200		
aaaagcgcc	acccttcggg	cgctgcgcgc	cctacgcccc	gccgcttcgc	gtcggcctat	7260		
cgcggccgct	ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	cagggcgcgg	7320		
acaagccgcg	ccgtcgccac	tcgaccgccc	gcgctgaggt	ctgcctcgtg	aagaagggtg	7380		
tgctgactca	taccaggcct	gaatcgcccc	atcatccagc	cagaaagtga	gggagccacg	7440		
gttgatgaga	gctttgttgt	aggtggacca	gttggtgatt	ttgaactttt	gctttgccac	7500		
ggaacgggtc	gcgttgctcg	gaagatgcgt	gatctgatcc	ttcaactcag	caaaagtctg	7560		
atttattcaa	caaagccgcc	gtcccgctca	gtcagcgtaa	tgctctgcca	gtgttacaac	7620		
caattaacca	attctgatta	gaaaaactca	tcgagcatca	aatgaaactg	caatttattc	7680		
atatcaggat	tatcaatacc	atatttttga	aaaagccggt	tctgtaatga	aggagaaaac	7740		
tcaccgaggc	agttccatag	gatggcaaga	tcctgggtatc	ggtctgcgat	tccgactcgt	7800		
ccaacatcaa	tacaacctat	taatttcccc	tcgtcaaaaa	taaggttatc	aagtgcagaaa	7860		
tcaccatgag	tgacgactga	atccggtagg	aatggcaaaa	gctctgcatt	aatgaatcgg	7920		
ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttcct	cgctcactga	7980		
ctcgctgcgc	tcggctcgct	ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	8040		
acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	8100		

```

aaaggccagg aaccgtaaaa agggcgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc 8160
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaacccga caggactata 8220
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 8280
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 8340
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 8400
accccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 8460
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 8520
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 8580
aacagtatgt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 8640
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg tttttgttt gcaagcagca 8700
gattacgcgc agaaaaaaa gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 8760
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 8820
cttcacctag atccttttga tccggaatta attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg 8880
gacgaacgga taaacctttt caccgccctt taaatatccg attattctaa taaacgctct 8940
tttctcttag gtttaccgc caatatatcc tgtcaaacac tgatagtta aactgaaggc 9000
gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga attaaggag tcacgttatg accccgcgcg 9060
atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt 9120
ggcgcagcg gccatttaaa tcaattgggc gcgcgaatt cgagctcggg ac 9172

```

<210> 45

<211> 8849

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність вектора pNOV4200

<400> 45

```

ggtacccccg ggggacctc tagagtcgac catgggtgatc actgcaggca tgcaagcttc 60
gtacgttaat taattcgaat ccggagcggc cgcacgcgtg ggcccggtta aacctcgaga 120
gatctgctag ccctgcagga aatttaccg tgcccgtagc ggatttggag ccaagtctca 180
taaacgccat tgtggaagaa agtcttgagt tgggtggaat gtaacagagt agtaagaaca 240
gagaagagag agagtgtgag atacatgaat tgtcgggcaa caaaaatcct gaacatctta 300
ttttagcaaa gagaaagagt tccgagtcgt tagcagaaga gtgaggagaa atttaagctc 360
ttggacttgt gaattgttcc gcctcttgaa tactctctca atcctcatat attcttcttc 420
tatgttacct gaaaaccggc atttaatctc gcgggtttat tccggttcaa catttttttt 480
gttttgagtt attatctggg cttaataacg caggcctgaa ataaattcaa ggcccaactg 540
tttttttttt taagaagttg ctgttaaaaa aaaaaaagg gaattaacaa caacaacaaa 600
aaaagataaa gaaaataata acaattactt taattgtaga ctaaaaaac atagatttta 660
tcatgaaaaa aagagaaaaa aaataaaaac ttggatcaaa aaaaaacata cagatcttct 720
aattattaac tttctttaa aattagggtc ttttcccaa caattagggt tagagttttg 780
gaattaaacc aaaaagattg ttctaaaaaa tactcaaatt tggtagataa gtttccttat 840
tttaattagt caatggtaga tacttttttt tcttttcttt attagagtag attagaatct 900
tttatgccaa gtattgataa attaaatcaa gaagataaac taccataatc aacatgaaat 960
taaaagaaaa atctcatata tagtattagt attctctata tatattatga ttgcttatcc 1020
ttaatggggt gggttaacca agacatagtc ttaatggaaa gaatcttttt tgaacttttt 1080
ccttattgat taaattcttc tatagaaaag aaagaaatta tttgaggaaa agtatatata 1140
aaaagaaaaa tagaaaaatg tcagtgaagc agatgtaatg gatgacctaa tccaaccacc 1200
accataggat gtttctactt gagtcggtct tttaaaaacg cacggtggaa aatatgacac 1260

```

gtatcatatg	attccttcct	ttagtttcgt	gataataatc	ctcaactgat	atcttccttt	1320
ttttgttttg	gctaaagata	ttttattctc	attaatagaa	aagacggttt	tgggcttttg	1380
gtttgcgata	taaagaagac	cttcgtgtgg	aagataataa	ttcatccttt	cgtctttttc	1440
tgactcttca	atctctccca	aagcctaaag	cgatctctgc	aaatctctcg	cgactctctc	1500
tttcaaggta	tattttctga	ttctttttgt	ttttgattcg	tatctgatct	ccaatttttg	1560
ttatgtggat	tattgaatct	ttgtataaaa	ttgcttttga	caatattgtt	cgtttcgtca	1620
atccagcttc	taaattttgt	cctgattact	aagatatcga	ttcgtagtgt	ttacatctgt	1680
gtaatttctt	gcttgattgt	gaaatttaga	ttttcaagga	cgatctattc	aattttttgtg	1740
ttttctttgt	tcgattctct	ctgttttagg	ttctttatgt	ttagatccgt	ttctcttttg	1800
tgttgttttg	atttctctta	cggtctttga	tttggtatat	gttcgctgat	tggtttctac	1860
ttgttctatt	gttttatttc	agggtgatct	cgactctagg	ggggcaataa	gatatgaaaa	1920
agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	cgaaaagttc	gacagcgtct	1980
ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	tttcagcttc	gatgtaggag	2040
ggcgtggata	tgctctcgcg	gtaaatagct	gcgccgatgg	ttctacaaa	gatcgttatg	2100
tttatcgga	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	agtgcctgac	attggggcat	2160
tcagcgagag	cctgacctat	tgcattctcc	gccgtgcaca	gggtgtcacg	ttgcaagacc	2220
tgcttgaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccggctgc	ggaggccatg	gatgcgatcg	2280
ctgcccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccatt	cggaccgcaa	ggaatcggtc	2340
aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	tccccatgtg	tatcactggc	2400
aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	ggctctcgat	gagctgatgc	2460
tttgggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	cgcggatttc	ggctccaaca	2520
atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	ctggagcgag	gcgatgttcg	2580
gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	gccgtggttg	gcttgatagg	2640
agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	tcgaggatcg	ccgcggctcc	2700
gggctgtatat	gctccgcatt	ggtcttgacc	aactctatca	gagcttggtt	gacggcaatt	2760
tcgatgatgc	agcttggggc	cagggtcgat	gcgacgcaat	cgtccgatcc	ggagccggga	2820
ctgtcgggcg	tacacaaaac	gcccgcagaa	gcgcggccgt	ctggaccgat	ggctgtgtag	2880
aagtactcgc	cgatagtggg	aaccgacgcc	ccagcactcg	tccgagggca	aaggaataga	2940
gtagatgccg	accgggatcc	ccgaatttcc	ccgatcgctc	aaacatttgg	caataaagtt	3000
tcttaagatt	gaatcctggt	gccggctctg	cgatgattat	catataattt	ctgttggaatt	3060
acgttaagca	tgtaataatt	aacatgtaat	gcattgacgtt	atttatgaga	tgggttttta	3120
tgattagagt	cccgcattta	tacatttaac	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	3180
actaggataa	attatcgcgc	gcggtgtcat	ctatgttact	agatcgggaa	ttgggtacgg	3240
gcggccagca	tggccgtatc	cgcaatgtgt	tattaagtgt	tctaagcgtc	aatttgttta	3300
caccacaata	tatcctgcc	ccagccagcc	aacagctccc	cgaccggcag	ctcggcacaa	3360
aatcaccact	cgatacaggc	agcccatcag	aattaattct	catgtttgac	agcttatcat	3420
cgactgcacg	gtgcaccaat	gcttctggcg	tcaggcagcc	atcgggaagct	gtggtatggc	3480
tgtgcaggtc	gtaaatcact	gcataattcg	tgtcgctcaa	ggcgcactcc	cgttctggat	3540
aatgtttttt	gcgcgcacat	cataacggtt	ctggcaaata	ttctgaaatg	agctgttgac	3600
aattaatcat	ccggctcgta	taatgtgtgg	aattgtgagc	ggataacaat	ttcacacagg	3660
aaacagacca	tgagggaagc	gttgatcgcc	gaagtatcga	ctcaactatc	agaggtagtt	3720
ggcgtcatcg	agcgcctatc	cgaaccgacg	ttgctggccg	tacatttgta	cggctccgca	3780
gtggatggcg	gcctgaagcc	acacagtgat	attgatttgc	tggttacggg	gaccgtaagg	3840
cttgatgaaa	caacgcggcg	agctttgatc	aacgaccttt	tggaaacttc	ggcttcccct	3900
ggagagagcg	agattctccg	cgctgtagaa	gtcaccattg	ttgtgcacga	cgacatcatt	3960
ccgtggcggt	atccagctaa	gcgcgaactg	caatttggag	aatggcagcg	caatgacatt	4020

cttgcaggt	tcttcgagc	agccacgat	gacattgat	tggctatct	gctgacaaa	4080
gcaagagaa	atagcgttg	cttggtaggt	ccagcggcg	aggaactct	tgatccggt	4140
cctgaacagg	atctatttg	ggcgctaaat	gaaacctta	cgctatggaa	ctcgccgccc	4200
gactgggctg	gcgatgagc	aaatgtagtg	cttacgttgt	cccgcatttg	gtacagcgca	4260
gtaaccggca	aaatcgcgcc	gaaggatgt	gctgccgact	gggcaatgga	gcgcctgccg	4320
gcccagtatc	agcccgtcat	acttgaagct	aggcaggctt	atcttgga	agaagatcg	4380
ttggcctcgc	gcgcagatca	gttgaagaa	ttgtttcact	acgtgaaagg	cgagatcacc	4440
aaagtagtcg	gcaaataaag	ctctagtgg	tctccgtacc	cccgggggat	ctggctcgcg	4500
gcggacgcac	gacgccgggg	cgagaccata	ggcgatctcc	taaatacaata	gtagctgtaa	4560
cctcgaagcg	tttcaacttg	aacaacgatt	gagaattttt	gtcataaaa	tgaaatactt	4620
ggttcgcatt	tttgtcatcc	gcggtcagcc	gcaattctga	cgaactgccc	atttagctgg	4680
agatgattgt	acatccttca	cgtgaaaatt	tctcaagcgc	tgtgaacaag	ggttcagatt	4740
ttagattgaa	aggtagccg	ttgaaacacg	ttcttcttgt	cgatgacgac	gtcgctatgc	4800
ggcatcttat	tattgaatac	cttacgatcc	acgccttcaa	agtgaccgcg	gtagccgaca	4860
gcacccagtt	cacaagagta	ctctcttccg	cgacggtcga	tgtcgtggtt	gttgatctag	4920
atttaggtcg	tgaagatggg	ctcgagatcg	ttcgtaatct	ggcggaag	tctgatattc	4980
caatcataat	tatcagtggc	gaccgccttg	aggagacgga	taaagttggt	gactcgagc	5040
taggagcaag	tgattttatc	gctaagccgt	tcagtatcag	agagtttcta	gcacgcattc	5100
gggttgccct	gcgcgtgcgc	cccaacgttg	tccgctccaa	agaccgacgg	tctttttggt	5160
ttactgactg	gacacttaat	ctcaggcaac	gtcgcctgat	gtccgaagct	ggcggtgagg	5220
tgaaaacttac	ggcaggtgag	ttcaatcttc	tcctcgcgtt	tttagagaaa	ccccgcgacg	5280
ttctatcgcg	cgagcaactt	ctcattgcc	gtcgagtacg	cgacgaggag	gtttatgaca	5340
ggagtataga	tgttctcatt	ttgaggctgc	gccgcaaaact	tgaggcagat	ccgtcaagcc	5400
ctcaactgat	aaaaacagca	agaggtgccg	gttatttctt	tgacgcggac	gtgcaggttt	5460
cgacggggg	gacgatggca	gcctgagcca	attccagat	ccccgaggaa	tcggcgtgag	5520
cggtcgcaaa	ccatccggcc	cggtacaaa	cggcgcggcg	ctgggtgatg	acctggtgga	5580
gaagttgaag	gccgcgcagg	ccgccagcg	gcaacgcac	gaggcagaag	cacgccccgg	5640
tgaatcgtgg	caagcggcg	ctgatcgaat	ccgcaaagaa	tcccggcaac	cgccggcagc	5700
cggtgcgcgc	tcgattagga	agccgcccaa	ggcgacgag	caaccagatt	ttttcgttcc	5760
gatgctctat	gacgtgggca	cccgcgatag	tcgcagcatc	atggacgtgg	ccgttttccg	5820
tctgtcgaag	cgtgaccgac	gagctggcga	ggtgatccgc	tacgagcttc	cagacgggca	5880
cgtagaggtt	tccgcagggc	cgcccgcat	ggccagtgtg	tgggattacg	acctggtact	5940
gatggcggtt	tcccatctaa	ccgaatccat	gaaccgatac	cgggaaggga	aggagacaa	6000
gcccggccgc	gtgttccgtc	cacacgttgc	ggacgtactc	aagttctgcc	ggcgagccga	6060
tggcggaag	cagaaagacg	acctggtaga	aacctgcatt	cggttaaaca	ccacgcacgt	6120
tgccatgcag	cgtacgaaga	aggccaagaa	cgccgcctg	gtgacggtat	ccgaggggtga	6180
agccttgatt	agccgctaca	agatcgtaaa	gagcgaacc	gggcggccgg	agtacatcga	6240
gatcgagcta	gctgattgga	tgtaccgcga	gatcacagaa	ggcaagaacc	cgacgtgct	6300
gacggttcac	cccgattact	ttttgatcga	tcccgcatc	ggccgttttc	tctaccgcct	6360
ggcacgccgc	gccgcaggca	aggcagaagc	cagatggttg	ttcaagacga	tctacgaacg	6420
cagtggcagc	gccggagagt	tcaagaagtt	ctgtttcacc	gtgcgcaagc	tgatcgggtc	6480
aaatgacctg	ccggagtacg	atttgaagga	ggaggcgggg	caggctggcc	cgatcctagt	6540
catgcgctac	cgcaacctga	tcgagggcga	agcatccgcc	ggttcctaat	gtacggagca	6600
gatgctaggg	caaattgccc	tagcagggga	aaaaggctga	aaaggctctt	ttcctgtgga	6660
tagcacgtac	attgggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggaaccgct	acattgggaa	6720
cccaaagccg	tacattggga	accggtcaca	catgtaagtg	actgatataa	aagagaaaaa	6780

```

aggcgatttt tccgcctaaa actctttaaa acttattaaa actcttaaaa cccgcctggc 6840
ctgtgcataa ctgtctggcc agcgcacagc cgaagagctg caaaaagcg ctaaccttcg 6900
gtcgtcgccg tccctacgcc ccgcgccttc gcgtcgccct atcgcgcccg ctggcccgctc 6960
aaaaatggct ggccctacgcc caggcaatct accaggcgcg ggacaagccg cgccgtcgcc 7020
actcgaccgc cggcgctgag gtctgcctcg tgaagaagg gttgctgact cataccaggc 7080
ctgaatcgcc ccatcatcca gccagaaagt gagggagcca cggttgatga gagctttggt 7140
gtagggtggc cagttggtga ttttgaactt ttgctttgcc acggaacggg ctgctgtgtc 7200
gggaagatgc gtgatctgat cttcaactc agcaaaagtt cgattttatt aacaaagccg 7260
ccgtcccgct aagtcagcgt aatgctctgc cagtgttaca accaattaac caattctgat 7320
tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcatatcagg attatcaata 7380
ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa actcacccag gcagttccat 7440
aggatggcaa gatcctggta tcggctcgcg attccgactc gtccaacatc aatacaacct 7500
attaatttcc cctcgtcaaa aataaggta tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact 7560
gaatccgggt agaatggcaa aagctctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg 7620
cggtttgctg attggcgct ctcccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 7680
tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc 7740
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 7800
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 7860
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 7920
cctggaagc tccctcgctg gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 7980
cgcttttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 8040
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 8100
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttatt 8160
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 8220
agagtctctg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 8280
cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa 8340
aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 8400
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 8460
ctcagcttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 8520
gatccggaat taattcctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 8580
ttcacgcccc tttaaatata cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttacc 8640
gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat 8700
catgagcgga gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg 8760
ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gctgcaggaa ttggccgcag cggccattta 8820
aatcaattgg gcgcgccgaa ttcgagctc 8849

```

<210> 46

<211> 2949

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність касети експресії ZmUbi-GFP-35S term

<400> 46

```

gcatgcctgc agtcagcgt gacccggtcg tgccctctc tagagataat gagcattgca 60
tgtctaagtt ataaaaaatt accacatatt ttttttgtca cacttggttg aagtgcagtt 120
tatctatctt tatacatata tttaaacctt actctacgaa taatataatc tatagtacta 180

```


caataatata	agtggttttag	agaatcatat	aatgaacag	ttagacatgg	tctaaaggac	240
aattgagtat	tttgacaaca	ggactctaca	gttttatctt	tttagtggtc	atgtgttctc	300
cttttttttt	gcaaataagt	tcacctatat	aatacttcat	ccattttatt	agtacatcca	360
tttaggggtt	aggggttaatg	gtttttatag	actaattttt	ttagtacatc	tattttattc	420
tatttttagcc	tctaaattaa	gaaaactaaa	actctatttt	agttttttta	tttaataaatt	480
tagatataaa	atagaataaa	ataaagtgc	taaaaattaa	acaaataccc	tttaagaaat	540
taaaaaaact	aaggaaacat	ttttcttggt	tcgagtagat	aatgccagcc	tgttaaacgc	600
cgctcgacgag	tctaaccgac	accaaccagc	gaaccagcag	cgctcgctcg	ggccaagcga	660
agcagacggc	acggcatctc	tgtcgctgcc	tctggacccc	tctcgagagt	tccgctccac	720
cgttggaact	gctccgctgt	cggcatccag	aaattgcgtg	gcggagcggc	agacgtgagc	780
cggcacggca	ggcggcctcc	tctcctctc	acggcacggc	agctacgggg	gattcctttc	840
ccaccgctcc	tctgctttcc	cttctctgcc	cgccgtaata	aatagacacc	ccctccacac	900
cctctttccc	caacctcgtg	ttgttcggag	cgcacacaca	cacaaccaga	tctcccccaa	960
atccaccctg	cggcacctcc	gcttcaagg	acgccgctcg	tctccccccc	ccccccctct	1020
ctaccttctc	tagatcggcg	ttccgggtcca	tgggttagggc	ccggtagttc	tacttctggt	1080
catgtttgtg	ttagatccgt	gtttgtgtta	gatccgtgct	gctagcgttc	gtacacggat	1140
gcgacctgta	cgtcagacac	gttctgattg	ctaacttgcc	agtggtttctc	tttggggaat	1200
cctgggatgg	ctctagccgt	tccgcagacg	ggatcgattt	catgattttt	tttgtttcgt	1260
tgcatagggt	ttgggtttgcc	cttttctctt	atttcaatat	atgccgtgca	cttgtttgtc	1320
gggtcatctt	ttcatgcttt	tttttgcctt	ggttgtgatg	atgtggtctg	gttgggcggg	1380
cgttctagat	cggagtagaa	ttctgtttca	aactacctgg	tggatttatt	aattttggat	1440
ctgtatgtgt	gtgccataca	tattcatagt	tacgaattga	agatgatgga	tggaaatata	1500
gatctaggat	aggtatacat	gttgatgcgg	gttttactga	tgcataataca	gagatgcttt	1560
ttgttcgctt	ggttgtgatg	atgtggtgtg	gttgggcggg	cgttcattcg	ttctagatcg	1620
gagtagaata	ctgtttcaaa	ctacctggtg	tatttattaa	ttttggaact	gtatgtgtgt	1680
gtcatacatc	ttcatagtta	cgagtttaag	atggatggaa	atatcgatct	aggataggta	1740
tacatgttga	tgtgggtttt	actgatgcac	atacatgatg	gcataatgcag	catctattca	1800
tatgctctaa	ccttgagtac	ctatctatta	taataaacia	gtatgtttta	taattatttt	1860
gatcttgata	tacttggtatg	atggcatatg	cagcagctat	atgtggattt	ttttagccct	1920
gccttcatac	gctatttatt	tgcttggtac	tgtttctttt	gtcgatgctc	accctgttgt	1980
ttgggtgttac	ttctgcagg	cgactctaga	ggatccacca	tgctgcagat	gagcaagggc	2040
gaggagctgt	tcaccggcgt	ggtgccaatc	ctggtggagc	tggacggcga	cgtgaacggc	2100
cacaagttca	gcgtgagcgg	cgagggcgag	ggcgacgcga	cctacggcaa	gctgaccctg	2160
aagttcatct	gtaccaccgg	caagctccc	gtcccgtggc	cgaccctggg	gaccaccttc	2220
acctacggcg	tgcagtgttt	cagccgctac	ccggaccaca	tgaagcgcca	cgacttcttc	2280
aagagcgcca	tgccggaggg	ctacgtgcag	gagcgaccca	tcagcttcaa	ggacgacggc	2340
aactacaaga	cccgcgccga	ggtgaagtgc	gagggcgaca	cactagtga	ccgcacgcag	2400
ctgaagggca	tgcacttcaa	ggaggacggc	aacatcctgg	gccacaagct	ggagtacaac	2460
tacaacagcc	acaacgtgta	catcaccgcg	gacaagcaga	agaacggcat	caaggcgaac	2520
ttcaagatcc	gccacaacat	cgaggacggc	agcgtgcagc	tggccgacca	ctaccagcag	2580
aacaccccca	tcggcgacgg	tctgtgtctg	ctgccggaca	accactacct	gagcaccacg	2640
agcgccctga	gcaaggaccc	gaacgagaag	cgcgaccaca	tgggtgtgct	ggagtctgtg	2700
accgccgcgg	gcatcaccca	cggcatggac	gagctgtaca	aggttacta	gagctcaaga	2760
tctgttctgc	acaaagtggg	gtagtgcagc	atcgatcagg	aaccagacac	cagactttta	2820
ttcatacagt	gaagtgaagt	gaagtgcagt	gcagtgaagt	gctgggtttt	gtacaactta	2880
gtatgtattt	gtatttgtaa	aatacttcta	tcaataaaat	ttctaattcc	taaaacccaa	2940

99	86341	100	
atccagtgg			2949
<210> 47			
<211> 4341			
<212> ДНК			
<213> Штучна			
<220>			
<223> Штучна послідовність касети експресії ZmUBI-GIG-nos			
<400> 47			
cctgcagtgc agcgtgaccc ggctcgtgcc ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct			60
aagttataaa aaattaccac atatTTTTTT tgtcacactt gtttgaagtg cagtttatct			120
atctttatac atatatTTaa actttactct acgaataata taatctatag tactacaata			180
atatcagtgt tttagagaat catataaatg aacagttaga catgggtctaa aggacaattg			240
agtattttga caacaggact ctacagtttt atcttttttag tgtgcatgtg ttctcctttt			300
tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac ttcattccatt ttattagtac atccatttag			360
ggtttagggg taatgggttt tatagactaa tttttttagt acatctatct tttctatctt			420
tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct atttttagtt ttttatttaa taatttagat			480
ataaaataga ataaaaataa gtgactaaaa attaaacaata taccctttta gaaattaaaa			540
aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag tagataatgc cagcctgtta aacgcgctcg			600
acgagtctaa cggacacca cccagcgaacc agcagcgtcg cgtcgggcca agcgaagcag			660
acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg acccctctcg agagtctcgc tccaccgttg			720
gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt gcgtggcgga gcggcagacg tgagccggca			780
cggcagggcg cctcctcctc ctctcacggc accggcagct acgggggatt cctttccac			840
cgctccttcg ctttcccttc ctcgccgccc gtaataaata gacacccctc ccacacccctc			900
tttccccaac ctctgttgtt tcggagcgca cacacacaca accagatctc ccccaaatcc			960
accgcgcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct cccccccccc cctctctac			1020
cttctctaga tcggcggttc ggtccatggt tagggcccg tagttctact tctgttcatt			1080
tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga			1140
cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg gggaatcctg			1200
ggatggctct agccgttcgc cagacgggat cgatttcatt attttttttg tttcgttgca			1260
tagggtttg tttgcccttt tcctttattt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt			1320
catcttttca tgcttttttt tgccttggtt gtgatgatgt ggtctgggtg ggcggtcgtt			1380
ctagatcgga gtagaattct gtttcaaaact acctgggtgga tttattaatt ttggatctgt			1440
atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc			1500
taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga tgctttttgt			1560
tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct agatcggagt			1620
agaatactgt ttcaaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca			1680
tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga taggtataca			1740
tggtgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg			1800
ctctaacctt gaggacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat tattttgatc			1860
ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt agccctgcct			1920
tcatacgcta tttatttgct tggtagtgtt tcttttgctg atgctcacc tggtgttttg			1980
tgttacttct gcagggatcc cctcgaggtc gaccatggtc cgtcctgtag aaacccaac			2040
ccgtgaaatc aaaaaactcg accgcctgtg ggcattcagt ctggatcgcg aaaactgtgg			2100
aattgatcag cgttggtggg aaagcgcgtt acaagaaagc cgggcaattg ctgtgccagg			2160
cagttttaac gatcagttcg ccgatgcaga tattcgtaat tatgcgggca acgtctggta			2220
tcagcgcgaa gtctttatac cgaaagggtg ggcaggccag cgtatcgtgc tgcgtttcga			2280

101

86341

102

tcgcggtcact	cattacggca	aagtgtgggt	caataatcag	gaagtgatgg	agcatcaggg	2340
cggctatacgc	ccatttgaag	ccgatgtcac	gccgtatggt	attgccggga	aaagtgtacg	2400
taagtttctg	cttctacctt	tgatataat	ataataatta	tcattaatta	gtagtaatat	2460
aataatttcaa	atattttttt	caaaataaaa	gaatgtagta	tatagcaatt	gcttttctgt	2520
agtttataag	tgtgtatatt	ttaatttata	acttttctaa	tatatgacca	aaatttgttg	2580
atgtgcaggt	atcacggtt	gtgtgaacaa	cgaactgaac	tggcagacta	tcccgcggg	2640
aatggtgatt	accgacgaaa	acggcaagaa	aaagcagctt	tacttccatg	atttctttaa	2700
ctatgccgga	atccatcgca	gcgtaatgct	ctacaccacg	ccgaacacct	gggtggacga	2760
tatcacgctg	gtgacgcatg	tcgcgcaaga	ctgtaaccac	gcgtctgttg	actggcaggt	2820
gggtggccaat	ggtgatgtca	gcgttgaact	gcgtgatgcg	gatcaacagg	tggttgcaac	2880
tggacaaggc	actagcggga	ctttgcaagt	ggtgaatccg	cacctctggc	aaccgggtga	2940
aggttatctc	tatgaactgt	gcgtcacagc	caaaagccag	acagagtgtg	atatctaccc	3000
gcttcgctgc	ggcatccggt	cagtggcagt	gaaggcgcaa	cagttcctga	ttaaccacaa	3060
accgttctac	tttactggct	ttggtcgtca	tgaagatgcg	gacttgctg	gcaaaggatt	3120
cgataacgtg	ctgatggtgc	acgaccacgc	attaatggac	tggattgggg	ccaactccta	3180
ccgtacctcg	cattaccctt	acgctgaaga	gatgctcgac	tgggcagatg	aacatggcat	3240
cgtggtgatt	gatgaaactg	ctgctgtcgg	ctttaacctc	tctttaggca	ttggtttcga	3300
agcgggcaac	aagccgaaag	aactgtacag	cgaagaggca	gtcaacgggg	aaactcagca	3360
agcgcaacta	caggcgatta	aagagctgat	agcgctgac	aaaaaccacc	caagcgtggt	3420
gatgtggagt	attgccaacg	aaccggatac	ccgtccgcaa	ggtgcacggg	aataattcgc	3480
gccactggcg	gaagcaacgc	gtaaactcga	cccgcgcgt	ccgatcacct	gcgtcaatgt	3540
aatgttctgc	gacgctcaca	ccgataccat	cagcgatctc	tttgatgtgc	tgtgcctgaa	3600
ccgttattac	ggatggtatg	tccaaagcgg	cgatttggaa	acggcagaga	aggtagtgga	3660
aaaagaactt	ctggcctggc	aggagaaact	gcatacagcg	attatcatca	ccgaatacgg	3720
cgtggatacgc	ttagccgggc	tgcaactcaat	gtacaccgac	atgtggagtg	aagagtatca	3780
gtgtgcatgg	ctggatatgt	atcacccgct	ctttgatcgc	gtcagcgccg	tcgtcgggtga	3840
acaggatagg	aatttcgcgc	attttgcgac	ctcgcaaggc	atattgcgcg	ttggcgggtaa	3900
caagaaaagg	atcttcactc	gcgaccgcaa	accgaagtgc	gcggcttttc	tgctgcaaaa	3960
acgctggact	ggcatgaact	tcggtgaaaa	accgcagcag	ggaggcaaac	aatgaatcaa	4020
caactctcct	ggcgaccat	cgctgggtac	agcctcggga	attagatccc	cgaatttccc	4080
cgatcggttca	aacatttggc	aataaagtgt	cttaagattg	aatcctgttg	ccggtccttg	4140
gatgattatc	atataatttc	tgttgaatta	cggttaagcat	gtaataatta	acatgtaatt	4200
catgacgtta	tttatgagat	gggtttttat	gattagagtc	ccgcaattat	acatttaata	4260
cgcgatagaa	aacaaaaatat	agcgcgcaaa	ctaggataaa	ttatcgcgcg	cgggtgtcatc	4320
tatgttacta	gatcgggaat	t				4341

<210> 48

<211> 2943

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність касети експресії Ubq3 (At)-synGFPI-

nos

<400> 48

accggatttg	gagccaagtc	tcataaacgc	cattgtggaa	gaaagtcttg	agttggtggt	60
aatgtaacag	agtagtaaga	acagagaaga	gagagagtgt	gagatacatg	aattgtcggg	120
caacaaaaat	cctgaacatc	ttatttttagc	aaagagaaaag	agttccgagt	ctgtagcaga	180

103			86341			104		
agagtgagga	gaaattttaag	ctcttggact	tgtgaattgt	tccgcctctt	gaatacttct	240		
tcaatcctca	tatatcttct	ttctatgta	cctgaaaacc	ggcattttaat	ctcgcggggt	300		
tattccgggt	caacattttt	ttgttttga	gttattatct	gggcctaata	acgcaggcct	360		
gaaataaatt	caaggcccaa	ctgtttttt	ttttaagaag	ttgctgttaa	aaaaaaaaa	420		
agggaattaa	caacaacaac	aaaaaaagat	aaagaaaata	ataacaatta	ctttaattgt	480		
agactaaaaa	aacatagatt	ttatcatgaa	aaaaagagaa	aagaaataaa	aacttggatc	540		
aaaaaaaaaa	catacagatc	ttctaattat	taacttttct	taaaaattag	gtcctttttc	600		
ccaacaatta	ggtttagagt	tttggaaata	aacccaaaag	attgttctaa	aaaatactca	660		
aatttggtag	ataagtttcc	ttattttaat	tagtcaatgg	tagatacttt	tttttctttt	720		
ctttattaga	gtagattaga	atcttttatg	ccaagtattg	ataaattaaa	tcaagaagat	780		
aaactatcat	aatcaacatg	aaattaaaag	aaaaatctca	tatatagtat	tagtattctc	840		
tatatatatt	atgattgctt	attcttaatg	ggttgggtta	accaagacat	agtcttaatg	900		
gaaagaatct	tttttgaact	ttttccttat	tgattaaatt	cttctataga	aaagaaagaa	960		
attatttgag	gaaaagtata	tacaaaaaga	aaaatagaaa	aatgtcagtg	aagcagatgt	1020		
aatggatgac	ctaattccaac	caccaccata	ggatgtttct	acttgagtcg	gtctttttaa	1080		
aacgcacggt	ggaaaatatg	acacgtatca	tatgattcct	tcctttagtt	tcgtgataat	1140		
aatcctcaac	tgatatcttc	ctttttttgt	tttggctaaa	gatattttat	tctcattaat	1200		
agaaaagacg	gttttgggct	tttggtttgc	gatataaaga	agaccttcgt	gtggaagata	1260		
ataattcatc	ctttcgtctt	ttctgactc	ttcaatctct	cccaaagcct	aaagcgatct	1320		
ctgcaaactc	ctcgcgactc	tctctttcaa	ggtatatatt	ctgattcttt	ttgtttttga	1380		
ttcgtatctg	atctccaatt	tttgttatgt	ggattattga	atcttttgta	taaattgctt	1440		
tgacaatat	tgttcgtttc	gtcaatccag	cttctaaatt	ttgtcctgat	tactaagata	1500		
tcgattcgta	gtgtttacat	ctgtgtaatt	tcttgcttga	ttgtgaaatt	aggattttca	1560		
aggacgatct	attcaatttt	tgtgttttct	ttgttcgatt	ctctctgttt	taggtttctt	1620		
atgttttagat	ccgtttctct	ttggtgttgt	tttgatttct	cttacggctt	ttgatttggg	1680		
atatgttcgc	tgattgggtt	ctacttgttc	tattgtttta	tttcagggtg	atccaccatg	1740		
ctgcagatga	gcaagggcga	ggagctgttc	accggcgtgg	tgccaatcct	ggtggagctg	1800		
gacggcgacg	tgaacggcca	caagttcagc	gtgagcggcg	agggcgaggg	cgacgcgacc	1860		
tacggcaagc	tgacctgaa	gttcactctg	accaccggca	agctcccggg	cccgtggccg	1920		
accctggtga	ccaccttcac	ctacggcgtg	cagtgtttca	gccgctaccc	ggaccacatg	1980		
aagcgccacg	acttcttcaa	gagcgccatg	ccggaggggt	acgtaagtgt	ctgcttctac	2040		
ctttgatata	tatataataa	ttatcattaa	ttagtagtaa	tataatattt	caaataattt	2100		
tttcaaaaata	aaagaatgta	gtatatagca	attgcttttc	tgtagtttat	aagtgtgtat	2160		
attttaattt	ataacttttc	taatatatga	ccaaaatttg	ttgatgtgca	ggtgcaggag	2220		
cgcaccatca	gcttcaagga	cgacggcaac	tacaagacct	gcgccgaggt	gaagtctcgag	2280		
ggcgacacac	tagtgaaccg	catcgagctg	aagggcatcg	acttcaagga	ggacggcaac	2340		
atcctggggc	acaagctgga	gtacaactac	aacagccaca	atgtgtacat	caccgcggac	2400		
aagcagaaga	acggcatcaa	ggcgaacttc	aagatccgcc	acaatatcga	ggacggcagc	2460		
gtgcagctgg	ccgaccacta	ccagcagaac	accccgatcg	gcgacgggtc	tgtgctgctg	2520		
ccggacaacc	actacctgag	caccagagc	gccctgagca	aggacctgaa	cgagaagcgc	2580		
gaccacatgg	tgctgctgga	gttcgtgacc	gccgcgggca	tcacctacgg	catggacgag	2640		
ctgtacaagg	ttaactagag	ctctagatcc	ccgaatttcc	ccgatcgttc	aaacatttgg	2700		
caataaagtt	tcttaagatt	gaatcctgtt	gccggtcttg	cgatgattat	catataattt	2760		
ctgttgaatt	acgttaagca	tgtaaataatt	aacatgtaat	gcatgacgtt	atztatgaga	2820		
tgggttttta	tgatttagagt	cccgcaatta	tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	2880		
tagcgcgcaa	actaggataa	attatcgcgc	gcggtgtcat	ctatgttact	agatcgggaa	2940		

ttg 2943

<210> 49

<211> 4072

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Штучна послідовність касети експресії Ubq3 (At)-GIG-nos

<400> 49

cggatttgga gccaaagtctc ataaacgccca ttgtggaaga aagtccttgag ttggtggttaa	60
tgtaacagag tagtaagaac agagaagaga gagagtgtga gatacatgaa ttgtcgggca	120
acaaaaatcc tgaacatctt attttagcaa agagaaagag ttccgagtcgt gtagcagaag	180
agtgaggaga aatttaagct cttggacttg tgaattgttc cgcctcttga atacttcttc	240
aatcctcata tattcttctt ctatgttacc tgaaaaccgg catttaaatct cgcgggttta	300
ttccggttca acattttttt tgttttgagt tattatctgg gcttaataac gcaggcctga	360
aataaattca aggcccaact gttttttttt ttaagaagtt gctgttaaaa aaaaaaaaaag	420
ggaattaaca acaacaacaa aaaaagataa agaaaataat aacaattact ttaattgtag	480
actaaaaaaaa catagatttt atcatgaaaa aaagagaaaa gaaataaaaa cttggatcaa	540
aaaaaaaaacat acagatcttc taattattaa ctttcttaa aaattagggtc ctttttccca	600
acaattaggt ttagagtttt ggaattaaac caaaaagatt gttctaaaaa atactcaa	660
ttggtagata agtttcttca ttttaattag tcaatggtag atactttttt ttcttttctt	720
tatttagagta gattagaatc ttttatgcca agtattgata aattaaatca agaagataaa	780
ctatcataat caacatgaaa ttaaaagaaa aatctcatat atagtattag tattctctat	840
atatattatg attgcttatt cttaatgggt tgggttaacc aagacatagt cttaatggaa	900
agaatctttt ttgaactttt tccttattga ttaaattctt ctatagaaaa gaaagaaatt	960
at ttgaggaa aagtatatac aaaaagaaaa atagaaaaat gtcagtgaag cagatgta	1020
ggatgacctc atccaaccac caccatagga tgtttctact tgagtcgggc ttttaaaaac	1080
gcacggtgga aaatatgaca cgtatcatat gattccttcc tttagtttcg tgataataat	1140
cctcaactga tatcttctt tttttgtttt ggctaaagat attttattct cattaataga	1200
aaagacgggt ttgggctttt ggtttgcat ataaagaaga ccttcgtgtg gaagataata	1260
attcatcctt tcgtcttttt ctgactcttc aatctctccc aaagcctaaa gcgatctctg	1320
caaatctctc ggcactctct ctttcaagggt atattttctg attctttttg tttttgattc	1380
gtatctgac tcctaatttt gtatgtgga ttattgaatc ttttgataaa attgcttttg	1440
acaatattgt tcgtttctgc aatccagctt ctaaattttg tcctgattac taagatatcg	1500
attcgtagtg ttacatctg tgtaatttct tgcttgattg tgaaattagg attttcaagg	1560
acgatctatt caatttttgc gttttctttg ttcgattctc tctgttttag gtttcttatg	1620
tttagatccg tttctctttg gtgtgtttt gatttctctt acggcttttg atttggtata	1680
tgttcgctga ttggtttcta cttgttctat tgttttattt cagggtgac ccctcgagg	1740
cgaccatggt ccgtcctgta gaaaccccaa cccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt	1800
gggcattcag tctggatcgc gaaaactgtg gaattgatca gcgttggttg gaaagcgcgt	1860
tacaagaaag ccgggcaatt gctgtgccag gcagttttta cgatcagttc gccgatgcag	1920
atattcgtaa ttatgcgggc aacgtctggt atcagcgcga agtcctttata ccgaaagggt	1980
gggcaggcca gcgtatctg ctgcttttcg atgcggtcac tcattacggc aaagtgtggg	2040
tcaataatca ggaagtgat gagcatcagg gcggctatcc gccatttgaa gccgatgtca	2100
cgccgtatgt tattgccggg aaaagtgtac gtaagtctct gcttctacct ttgatata	2160
tataataatt atcattaatt agtagtaata taatatttca aatatttttt tcaaaaataa	2220
agaatgtagt atatagcaat tgcttttctg tagtttataa gtgtgtatat ttttaatttat	2280

107			86341			108		
aacttttcta	atatatgacc	aaaatttgtt	gatgtgcagg	tatcaccggt	tgtgtgaaca	2340		
acgaactgaa	ctggcagact	atccgcgcgg	gaatggtgat	taccgacgaa	aacggcaaga	2400		
aaaagcagtc	ttacttccat	gatttcttta	actatgccgg	aatccatcgc	agcgtaatgc	2460		
tctacaccac	gccgaacacc	tgggtggacg	atatcaccggt	ggtgacgcat	gtcgcgcaag	2520		
actgtaacca	cgcgtctggt	gactggcagg	tgggtggccaa	tggtgatgtc	agcgttgaac	2580		
tgcgtgatgc	ggatcaacag	gtggttgcaa	ctggacaagg	cactagcggg	actttgcaag	2640		
tggatgaatcc	gcacctctgg	caaccgggtg	aaggttatct	ctatgaactg	tgcgtcacag	2700		
ccaaaagcca	gacagagtgt	gatatctacc	cgttctcgtt	cggcatccgg	tcagtggcag	2760		
tgaagggcga	acagttcctg	attaaccaca	aaccgttcta	ctttactggc	tttggtcgtc	2820		
atgaagatgc	ggacttgctg	ggcaaaggat	tcgataacgt	gctgatggtg	cacgaccacg	2880		
cattaatgga	ctggattggg	gccaaactcct	accgtacctc	gcattaccct	tacgtggaag	2940		
agatgctcga	ctgggcagat	gaacatggca	tcgtggtgat	tgatgaaact	gctgctgtcg	3000		
gctttaacct	ctctttaaggc	attggtttcg	aagcgggcaa	caagccgaaa	gaactgtaca	3060		
gcgaagaggg	agtcaacggg	gaaactcagc	aagcgcactt	acaggcgatt	aaagagctga	3120		
tagcgcgtga	caaaaaccac	ccaagcgtgg	tgatgtggag	tattgccaac	gaaccggata	3180		
cccgtccgca	aggtgcacgg	gaatatctcg	cgccactggc	ggaagcaacg	cgtaaaactcg	3240		
accgcagcgc	tccgatcacc	tgcgtcaatg	taatgttctg	cgcgctcac	accgatacca	3300		
tcagcgatct	ctttgatgtg	ctgtgcctga	accgttatta	cggatggtat	gtccaaagcg	3360		
gcgatttgga	aacggcagag	aaggtaactg	aaaaagaact	tctggcctgg	caggagaaac	3420		
tgcacagccc	gattatcatc	accgaatacg	gcgtggatac	gttagccggg	ctgcactcaa	3480		
tgtacaccga	catgtggagt	gaagagtatc	agtgtgcatg	gctggatatg	tatcacgcgc	3540		
tctttgatcg	cgtcagcgcc	gtcgtcggtg	aacaggtatg	gaatttcgcc	gattttgcga	3600		
cctcgcaagg	catattgcgc	gttggcggta	acaagaaagg	gatcttctact	cgcgaccgca	3660		
aaccgaagtc	ggcggctttt	ctgctgcaaa	aacgctggac	tggcatgaac	ttcggtgaaa	3720		
aaccgcagca	gggaggcaaa	caatgaatca	acaactctcc	tggcgacca	tcgtcggcta	3780		
cagcctcggg	aattagatcc	ccgaatttcc	ccgatcgttc	aaacatttgg	caataaagtt	3840		
tcttaagatt	gaatcctggt	gccggtcttg	cgatgattat	catataattt	ctggtgaatt	3900		
acgttaagca	tgtataaatt	aacatgtaat	gcatgacggt	atttatgaga	tgggttttta	3960		
tgattagagt	cccgaatta	tacatttaat	acgcgataga	aaacaaaata	tagcgcgcaa	4020		
actaggataa	attatcgcgc	gcggtgtcat	ctatgttact	agatcgggaa	tt	4072		