

Цей винахід має відношення до стійких до гліфосату рослин цукрового буряку, матеріалу рослинного походження та насіння.

Цукровий буряк (*Beta vulgaris*) вирощують як товарну культуру у багатьох країнах із загальним врожаєм, що перевищує 240 мільйонів тон.

N-фосфометилглїцин, загальновідомий як гліфосат, є гербіцидом широкого спектру дії, який широко застосовується завдяки його високій ефективності, здатності до біологічного розкладання та низького рівня токсичності для тварин та людей. Гліфосат інгібує шлях шикімової кислоти, який забезпечує біосинтез ароматичних сполук, у тому числі амінокислот та вітамінів. Зокрема, гліфосат інгібує перетворення фосфоенолпіровиноградної кислоти та 3-фосфошикімової кислоти на 5-енолпірувіл-3-фосфошикімову кислоту шляхом інгібування ферменту, 5-енолпірувіл-3-фосфошикімової синтази (EPSP синтаза або EPSPS). У разі обробки звичайних рослин гліфосатом, ці рослини не можуть продукувати ароматичні амінокислоти (наприклад, фенілаланін та тирозин), необхідні для росту та виживання. EPSPS є присутньою в усіх рослинах, бактеріях та грибах. Вона відсутня у тварин, які не синтезують своїх власних ароматичних амінокислот. Оскільки шлях біологічного синтезу ароматичних амінокислот у ссавців, птахів або представників водної флори та фауни є відсутнім, гліфосат для цих організмів є зовсім нетоксичним або слаботоксичним. Фермент EPSPS є, звичайно, присутнім у харчових продуктах, які походять із рослинних або мікробних джерел.

Гліфосат є активною складовою такого гербіциду, як раундап (Roundup®), що виробляється фірмою Monsanto Company, США. Цей гербіцид, як правило, має форму водорозчинної солі, наприклад, солі амонію, алкіламіну, лужного металу або триметилсульфонію. Однією з найпоширеніших форм є ізопропіламінова сіль гліфосату, яка являє собою форму, що застосовується у гербіциді раундап.

Було показано, що стійкі до гліфосату рослини можна одержати шляхом введення до геному рослини здатності до продукування EPSP синтази, яка є стійкою до гліфосату, наприклад, CP4-EPSPS від *Agrobacterium* sp., штам CP-4.

Рослину цукрового буряка, стійку до гліфосату, можна одержати шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, завдяки введенню гена, що кодує EPSP синтазу, стійку до гліфосату, наприклад, CP4-EPSPS, до геному рослини. Така рослина цукрового буряка, що експресує CP4-EPSPS, описана у WO 99/23232. Однак рослини цукрового буряка, вирощені з клітин, подібним чином трансформованих геном CP4-EPSPS, широко різняться за своїми характеристиками унаслідок того, що ген вставляють до геному рослини у довільному положенні. Введення конкретного трансгену до конкретної ділянки на хромосомі часто називають "подією". Термін "подія" часто застосовують також для відрізнєння сільськогосподарських культур, що були піддані обробці за методами рекомбінантних ДНК. Бажані події є дуже рідкими. Значна більшість подій відбраковується, оскільки трансген, вставлений до гену рослини, важливого для росту, викликає руйнування цього гену або перешкоджає його експресії, або ж вставлений трансген потрапляє до тієї частини хромосоми, що не забезпечує експресії цього трансгену або експресію дуже низького рівня. Це є причиною скринінгу великої кількості подій для ідентифікації події, що характеризується достатнім рівнем експресії введеного гена. Ця процедура є дуже трудомісткою, поглинає багато часу і у жодному разі не гарантує того, що може бути знайдена рослина із задовільними властивостями.

Таким чином, мета цього винаходу полягає у наданні рослини цукрового буряка, яка демонструє високий рівень стійкості до гліфосату, однак позбавлена недоліків відносно інших важливих агрономічних властивостей, а саме росту, врожаю, якості, стійкості до патогенів тощо.

Стійка до гліфосату рослина цукрового буряка за цим винаходом відрізняється тим, що а) згадану рослину цукрового буряка одержують із насіння, депонованого у NCIMB (Національна колекція промислових мікроорганізмів, Абердін, Шотландія, Великобританія), що має номер депонування NCIMB 41158 або NCIMB 41159 та/або б) фрагмент ДНК довжиною 630-700п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 664п.н., може бути ампліфікованим з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №1, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №2, та/або с) фрагмент ДНК довжиною 3500-3900п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 3706п.н., може бути ампліфікованим із геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №3, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №4, та/або d) фрагмент ДНК довжиною 270-300п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 288п.н., може бути ампліфікованим з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №7, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №8, та/або e) фрагмент ДНК довжиною 710-790п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 751п.н., може бути ампліфікованим із геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №9, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №10, та/або f) фрагмент ДНК довжиною 990-1100п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 1042п.н., може бути ампліфікованим із геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №14 та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №16.

Полімеразно-ланцюгова реакція (PCR) є добре відомим стандартним методом, що застосовується для ампліфікації молекул нуклеїнових кислот (дивись, наприклад, патент США №4,683,202).

Рослина цукрового буряку за цим винаходом (на яку у подальшому посилаються, як на "подію H7-1"), демонструє високу стійкість до гербіциду гліфосат. На додаток до цього, процес трансформації не чинить від'ємного впливу на характеристики росту та інші важливі агрономічні властивості події H7-1. Подія H7-1 експресує високий рівень гена *Agrobacterium*-CP4-EPSPS, який стабільно включається до геному рослини і який надає рослині стійкості до гліфосату. Згадану рослину одержують за технологією *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації із застосуванням бінарного вектора PV-BVGT08. Цей вектор, у межах від лівої до правої граничних ділянок, містить такі послідовності: кодувальну ділянку, що складається з кодувальної

послідовності перехідного пептиду хлоропластів EPSPS *Arabidopsis thaliana* (яка позначається як ctp2), сполучену з кодувальною послідовністю CP4-EPSPS під регуляцією промотору вірусу мозаїки ранника (*Scrophularia*) (pFMV), і послідовність термінації транскрипції *Pisum sativum*.

За варіантом прикладу здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, фрагменти ДНК довжиною 3706п.н., 664п.н., 288п.н., 751п.н. і 1042п.н. демонструють щонайменше 95%, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше 99%, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, щонайменше 99,9% ідентичність з такими нуклеотидними послідовностями: Послідовність №6, Послідовність №13, Послідовність №11, Послідовність №12 або Послідовність №17, відповідно. 95% ідентичність, наприклад, означає, що 95% нуклеотидів даної послідовності є ідентичними з тією послідовністю, з якою вона порівнюється. З цією метою, послідовності можуть впорядковано розміщуватись і порівнюватись із застосуванням програми BLAST (доступної, наприклад, на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, фрагмент ДНК довжиною 3706п.н. має нуклеотидну Послідовність №6; фрагмент ДНК довжиною 664п.н. має нуклеотидну Послідовність №13; фрагмент ДНК довжиною 288п.н. має нуклеотидну Послідовність №11; фрагмент ДНК довжиною 751п.н. має нуклеотидну Послідовність №12, та/або фрагмент ДНК довжиною 1042п.н. має нуклеотидну Послідовність №17.

Цей винахід має також відношення до насіння, депонованого у NCIMB (Національна колекція промислових мікроорганізмів, Абердін, Шотландія, Великобританія), що має номер депонування NCIMB 41158 або NCIMB 41159. Таке насіння може використовуватись для одержання стійкої до гліфосату рослини цукрового буряку. Це насіння може висіватись, і рослина, що виросте, буде стійкою до гліфосату.

Цей винахід має також відношення до клітини, тканини або частини стійкої до гліфосату рослини цукрового буряку.

Іншим аспектом цього винаходу є спосіб ідентифікації стійкої до гліфосату рослини цукрового буряку, який відрізняється тим, що включає стадію(-ї) а) ампліфікації фрагменту ДНК довжиною 630-700п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 664п.н., з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №1, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №2, та/або б) ампліфікації фрагменту ДНК довжиною 3500-3900п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 3706п.н., з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №3, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №4, та/або с) ампліфікації фрагменту ДНК довжиною 270-300п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 288п.н., з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №7, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №8, та/або d) ампліфікації фрагменту ДНК довжиною 710-790п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 751п.н., з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №9, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №10, та/або е) ампліфікації фрагменту ДНК довжиною 990-1100п.н., за варіантом, якому віддають перевагу, довжиною 1042п.н., з геномної ДНК згаданої рослини цукрового буряку, її частин або насіння, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з першим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №14, та другим праймером, що має нуклеотидну Послідовність №16.

Згаданий спосіб надає можливість легкого виявлення трансгенної стійкої до гліфосату рослини цукрового буряку за допомогою стандартних методів молекулярної біології.

Цей винахід має додаткове відношення до тест-набору для ідентифікації трансгенної стійкої до гліфосату рослини цукрового буряку або її клітин, тканини або частин. До складу згаданого набору входить щонайменше одна пара праймерів із першим і другим праймером для полімеразно-ланцюгової реакції, яка забезпечує можливість специфічної ідентифікації події Н7-1, її клітин, тканини або частин.

За варіантом, якому віддають перевагу, перший праймер має нуклеотидну Послідовність №1, або Послідовність №7, або Послідовність №9, або Послідовність №14, а другий праймер має нуклеотидну Послідовність №2, або Послідовність №8, або Послідовність №10, або Послідовність №16.

За додатковим прикладом здійснення цього винаходу, кожен із цих праймерів, перший та другий, розпізнає нуклеотидну послідовність, яка становить частину нуклеотидної Послідовності №5.

Подані нижче фігури призначені для пояснення винаходу.

Фіг.1. Карта бінарного вектора PV-BVGT08.

Фіг.2. Ідентифікація Н7-1 шляхом аналізу із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції. Аналізу були піддані зразки ДНК 18 рослин. Негативний контроль: ДНК нетрансформованого цукрового буряку; позитивний контроль: ДНК оригінального трансформанта Н7-1.

Фіг.3. Ідентифікація події Н7-1 за допомогою мультиплексної полімеразно-ланцюгової реакції і розрізнення трансгенної події Н7-1 і нетрансгенних рослин. Аналізу були піддані зразки ДНК 54 рослин.

Фіг.4. Інсерційний сегмент pFMV-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3' із сайтами розщеплення рестриктазами HindIII, XbaI, ClaI, PstI і BamHI.

Фіг.5. Аналіз інсерційного сегменту/кількості копій події Н7-1. Для саузерн-блотингу, 10мкг геномної ДНК Н7-1 розщеплювали PstI, HindIII, XbaI, ClaI і BamHI (стовпчики 3-7). Нетрансформовану геномну ДНК, як негативний контроль, розщеплювали BamHI (стовпчик 8). Плазмиду PV-BVGT08, як позитивний контроль, розщеплювали BamHI. Стовпчики 2 та 9 зображають маркери розміру. Блот зондували ³²P-міченою кодувальною ділянкою CP4-EPSPS. Згаданий зонд являє собою внутрішню послідовність гена CP4-EPSPS, що охоплює пари нуклеотидів 447-1555.

Фіг.6. Саузерн-блотинг події Н7-1 для визначення цілісності кодувальної ділянки ctp2-CP4-EPSPS. 10мкг геномної ДНК Н7-1, нетрансгенної контрольної ДНК та нетрансгенної контрольної ДНК, змішаної з PV-BVGT08, розщеплювали XbaI та HindIII/BamHI. Блот зондували ³²P-міченим PCR-фрагментом CP4-EPSPS.

Фіг.7. Саузерн-блотинг події Н7-1 для визначення цілісності промоторної ділянки. 10мкг геномної ДНК Н7-

1, нетрансгенної контрольної ДНК та нетрансгенної контрольної ДНК, змішаної з PV-BVGT08, розщеплювали HindIII, XbaI та SacI/XhoI. Блот зондували ³²P-міченим промоторним фрагментом (HindIII)(=послідовність PV-BVGT08, 7972-8583п.н.) або касетою повний промотор-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3' (PmeI/XhoI)(=послідовність PV-BVGT08, 7935-2389п.н.).

Фіг.8. Саузерн-блотинг події H7-1 для визначення цілісності ділянки поліаденілування. 10мкг геномної ДНК H7-1, нетрансгенної контрольної ДНК та нетрансгенної контрольної ДНК, змішаної з PV-BVGT08, розщеплювали EcoRI/PstI, XbaI, HindIII і PstI. Блот зондували ³²P-міченим фрагментом ділянки поліаденілування E9-31' (BamHI/XhoI)(=послідовність PV-BVGT08, 1702-2389п.н.).

Фіг.9. Фрагменти, застосовані як зонди для визначення відсутності остовної векторної ДНК у події H7-1.

Фіг.10. Саузерн-блотинг події H7-1 для визначення відсутності остовної векторної ДНК у події H7-1. 10мкг геномної ДНК H7-1, нетрансгенної контрольної ДНК та нетрансгенної контрольної ДНК, змішаної з PV-BVGT08, розщеплювали XbaI. Блоти зондували ³²P-міченими зондами, що охоплюють остов PV-BVGT08 у цілому (зонд 1-4).

Фіг.11. Порівняння між PCR-фрагментами і послідовностями PV-BVGT08 на лівій граничній ділянці.

Фіг.12. Порівняння між PCR-фрагментами і послідовностями PV-BVGT08 на правій граничній ділянці.

Фіг.13. Аналіз геномної ДНК за межами правого зчленування інсерційного сегменту. Приблизно 50нг геномної ДНК події H7-1 або нетрансгенної контрольної ДНК чи води застосовували для полімеразно-ланцюгових реакцій з комбінаціями праймерів P1, де обидва праймери розташовані за межами інсерційного сегменту, та P3, де один праймер знаходиться у межах інсерційного сегменту, а другий праймер лежить за його межами.

Фіг.14. Аналіз геномної ДНК за межами лівого зчленування інсерційного сегменту. Приблизно 50нг геномної ДНК події H7-1 або нетрансгенної контрольної ДНК чи води застосовували для полімеразно-ланцюгових реакцій з комбінаціями праймерів P2, де обидва праймери розташовані за межами інсерційного сегменту, та P4, де один праймер знаходиться у межах інсерційного сегменту, а другий праймер лежить за його межами.

Фіг.15. Карта за потомством партій насіння H7-1.

Фіг.16. Саузерн-блотинг події H7-1 для визначення того, чи стабільно інтегрується ДНК-вставка до геному. 10мкг геномних ДНК H7-1 (оригінальний трансформант H7-1-1995 і три потомства, від H7-1-1996 до 1998) і нетрансгенні контрольні ДНК із різних джерел розщеплювали BamHI, XbaI і HindIII. Блот зондували ³²P-міченим CP4-EPSPS зондом PV-BVGT08 (=447-1555п.н.).

Цей винахід додатково визначається, виключно ілюстративним шляхом, посиланням на наведені нижче приклади.

Нижче наведено перелік скорочень, що застосовуються:

~	приблизно
°C	градус за Цельсієм
Bidest	подвійно дистильована стерильна вода
Bp	пара(-и) нуклеотидів
СТАВ	цетилтриметиламонію бромід
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
E.coli	Escherichia coli
EDTA	етилендіамінтетраоцтова кислота
Фіг.	фігура
год	година
HCl	хлористоводнева кислота
тис.п.н.	тисяч пар нуклеотидів
кг	кілограм
M, mM	мольний, мілімольний
хв	хвилини
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	фосфат натрію
NaCl	хлорид натрію
NaOH	гідроксид натрію
Nt	нуклеотид
PCR	полімеразно-ланцюгова реакція
пмоль	пікомоль
Rnase	РНКаза
об/хв	обертів на хвилину
RR	Roundup Ready [®]
К.Т.	кімнатна температура
SDS	додецилсульфат натрію
с	секунда
SEVAG	хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1)
SSC	стандартний цитратний фізіологічний розчин

TE	буфер трис-етилендіамінтетраоцтова кислота
TRIS	трис(гідроксиметил)амінометан

Приклад 1

Ідентифікація події Н7-1

Цукровий буряк (*Beta vulgaris*) генотипу 3S0057 піддавали генетичній модифікації для експресії CP4-5-енолпірувілкімат-3-фосфатсинтази або CP4-EPSPS, яка забезпечує стійкість до гербіциду гліфосату, а також застосовується як селектований маркер. Цю трансгенну лінію одержали шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації із застосуванням бінарного вектора PV-BVGT08. Між лівою та правою граничною ділянками матричної ДНК вектора, що застосовувався для трансформації цукрового буряку, знаходяться такі послідовності: кодувальна ділянка, що складається з кодувальної послідовності перехідного пептиду хлоропластів EPSPS *Arabidopsis thaliana* (яка позначається як *ctp2*), сполучена з кодувальною послідовністю CP4-EPSPS під регуляцією 35S-промотору вірусу мозаїки ранника (*Scrophularia*) (pFMV), і послідовність термінації транскрипції 3' гена *rbcS-E9 Pisum sativum*.

Були застосовані такі методи:

I. Екстракція ДНК

Метод 1:

Збирали свіже листя або іншу тканину (від 20мг до 100мг до 1,5мл пробірки) і додавали 400мкл екстракційного буфера (дивись нижче). Згадану тканину подрібнювали невеликим товкачиком. Суміш центрифугували впродовж 5с і інкубували від 30хв. до 60хв. при кімнатній температурі з подальшою стадією центрифугування при 13000об./хв. впродовж 1хв. Супернатант, що містив ДНК, виливали до нової 1,5мл пробірки і змішували з 320мкл ізопропанолу. Одержану суміш інкубували при кімнатній температурі впродовж 2хв. Після додання етанолу утворюється осад ДНК. Етанол зливали після центрифугування при 13000об./хв. впродовж 5хв. Одержаний зразок піддавали повітряному сушінню. Осад повторно розчиняли у 400мкл H₂O або TE-буфера (дивись нижче).

Екстракційний буфер (100мл):

20мл	1M TRIS (pH 7,5)
5мл	5M NaCl
5мл	0,5M EDTA
2,5мл	20% SDS
67,2мл	H ₂ O

TE-буфер:

10мМ трис-НСІ (pH8,0)

1мМ EDTA

Метод 2:

Свіжий матеріал рослинного походження (від 20мг до 100мг) збирали до 1,5мл еппендорфівської пробірки і додавали 500мкл СТАВ-буфера (65°C, дивись нижче). Одержану суміш інкубували від 1год. до 1,5год. При температурі 65°C, після чого центрифугували впродовж 5с. Додавали 5мкл РНКази (10мг/мл). Суміш інкубували впродовж 30хв. при температурі 37°C, після чого центрифугували впродовж 5с. Додавали 200мкл SEVAG. Після перемішування та центрифугування при 13000об./хв. впродовж 10хв. супернатант переносили до нової 1,5мл пробірки. Із згаданим супернатантом обережно змішували 1 об'єм ізопропанолу (приблизно 400мкл) з подальшим центрифугуванням при 13000об./хв. впродовж 10хв. Додавали 600мкл 70% етанолу. Одержаний осад промивали шляхом перевертання пробірки декілька разів. Суміш знову центрифугували при 13000об./хв. впродовж 2хв. Етанол обережно видаляли. Пробірку перевертали і спорожнювали на чистий папір. Одержаний зразок піддавали повітряному сушінню впродовж 15хв. Осад повторно розчиняли у 50мкл H₂O (дивись нижче).

СТАВ-буфер:

1,4M NaCl

20мМ EDTA

100мМ трис-НСІ

2% (у відношенні маси до об'єму) СТАВ

SEVAG:

Хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1)

РНКаза-буфер:

10мМ трис, 15мМ NaCl, pH7,5

РНКаза А:

10мг РНКази/мл РНКаза-буфера

(5мл подвійно дистильованої стерильної води+50мг РНКази А, аліквоти у 1,5мл пробірках, пробірки кип'ятити впродовж 30хв. при температурі 100°C, зберігати при температурі -20°C).

Як правило, застосовували Метод 1. За цим методом можна екстрагували велику кількість зразків ДНК/день і якість ДНК є прийнятною. Метод 2 застосовували у разі, коли листовий матеріал був старішим або якщо виникали проблеми з якістю ДНК. Метод 2 є складнішим, потребує більше часу і дає нижчий вихід ДНК, хоча і більш високої якості.

До кількісного визначення ДНК, як правило, не вдавались, а для проведення полімеразно-ланцюгової реакції застосовували, як правило, від 0,5мкл до 1мгл розчину екстрагованої ДНК.

II. Полімеразно-ланцюгова реакція:

Для полімеразно-ланцюгової реакції одержували 10х буферну суміш: буфер+dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфат). Ця процедура має такий вигляд:

Концентрований розчин	Об'єм	3-10х концентрація буфера	Кінцева концентрація реакційної суміші полімеразно-ланцюгової реакції
1M TRIS-HCl pH8,3	100мкл	0,1M	10mM TRIS-HCl pH8,3
1M KCl	500мкл	0,5M	50mM KCl
100mM дезоксиаденозин-5'-трифосфат (dATP)	20мкл	2mM	0,2mM dATP
100mM дезоксицитидин-5'-трифосфат (dCTP)	20мкл	2mM	0,2mM dCTP
100mM дезокситимідин-5'-трифосфат (dTTP)	20мкл	2mM	0,2mM dTTP
100mM дезоксигуанозин-5'-трифосфат (dGTP)	20мкл	2mM	0,2mM dGTP
100mM MgCl ₂	150мкл	15mM	1,5mM MgCl ₂
вода для високоефективної рідинної хроматографії			
	разом 1000мкл		

Полімеразно-ланцюгова реакція (25мкл):

ДНК	0,5мкл
Праймер 1	1мкл (20пмоль)
Праймер 2	1мкл (20пмоль)
Тақ-полімераза I	0,2мкл (1Од, від фірми Oncor Appligene S.A., Heidelberg, Німеччина)
Буфер 10х концентрації	2,5мкл
Вода	18,8мкл

III. Ідентифікація H7-1 за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції Ідентифікацію H7-1 здійснювали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції із застосуванням праймерів, специфічних для події: Верхній праймер (Послідовність №1):

H7-207U30: 5' TTA ATT TTT GCA GGC GAT GGT GGC TGT TAT 3'

Нижній праймер (Послідовність №2):

H7-841L30: 5' CAT ACG CAT TAG TGA GTG GGC TGT CAG GAC 3'

Згаданий верхній праймер знаходиться за межами інсерційного сегменту і є частиною геномної ДНК цукрового буряка. Згаданий нижній праймер знаходиться у межах інсерційного сегменту гена CP4-EPSPS.

Умови проведення полімеразно-ланцюгової реакції:

94°C, 4хв. Стадія 1

95°C, 30с Стадія 2a

55°C, 30с Стадія 2b

72°C, 2хв. Стадія 2c

72°C, 5хв. Стадія 3

4°C, впродовж ночі Стадія 4

реакція завершена

Стадії 2a-с були повторені 34 рази.

Очікуваним продуктом полімеразно-ланцюгової реакції є фрагмент ДНК (664п.н., Послідовність №13, дивись Фіг.2).

IV. Ідентифікація H7-1 за допомогою мультигоїєксної полімеразно-ланцюгової реакції

Для розрізнення нетрансгенних і трансгенних рослин (гомозиготних або гемі/гетерозиготних) вдавались до мультиплексної полімеразно-ланцюгової реакції з трьома різними праймерами. Були застосовані наведені нижче праймери:

H72 (Послідовність №14):

5' GCTCTGACACAACCGGTAAATGCATTGGCC 3'

H7S2 (Послідовність №15): 5' GAC CCATAGTTTGAATTTAAGCACGACATG 3'

H7R2 (Послідовність №16): 5' GCAGATTCTGCTAACTTGCGCCATCGGAG 3'

Умови проведення полімеразно-ланцюгової реакції:

94°C, 2хв. Стадія 1

94°C, 1с Стадія 2a

60°C, 45с Стадія 2b

72°C, 90с Стадія 2c

72°C, 5хв. Стадія 3

4°C, впродовж ночі Стадія 4

реакція завершена

Стадії 2a-с були повторені 34 рази.

Нетрансгенні рослини демонструють лише один PCR-фрагмент (приблизно 350п.н.). Гомозиготні трансгенні рослини демонструють один фрагмент (приблизно 1,042тис.п.н.). гетерозиготні рослини

демонструють обидва фрагменти (дивись Фіг.3).

Приклад 2

Визначення характеристик події H7-1

Молекулярний аналіз було здійснено з метою визначення характеристик інтегрованої ДНК, присутньої у події H7-1. Зокрема, визначили кількість інсерційних сегментів (кількість інтеграційних сайтів у межах геному цукрового буряку), кількість копій (кількість фрагментів ДНК у межах одного локусу), цілісність вставленої кодувальної ділянки та її регуляторних елементів, послідовність термінації транскрипції промотору rFMV та E9-3', відсутність основних послідовностей вектора, що застосовувався для трансформації та стабільного успадковування інсерційного сегменту. Додатково були ідентифіковані послідовності, що фланкують ДНК-вставку.

Характеристики ДНК-вставки трансформаційної події H7-1 цукрового буряку визначали із застосуванням саузерн-блотингу, полімеразно-ланцюгової реакції та зворотної полімеразно-ланцюгової реакції. Були включені позитивні та негативні контролі (PV-BVGT08, нетрансгенна рослинна ДНК), які піддавали такій самій обробці, що і експериментальну речовину (H7-1).

ДНК була виділена з партії №74903H рослин події H7-1, які були вирощені у 1997 році. ДНК також виділили з оригінального трансформанту H7-1/3S0057 (=6401VN) у 1995 році та з трьох додаткових потомств, які одержали у 1996, 1997 та 1998 роках. (H7-1/64801H, H7-1/74922H і H7-1/83002S).

Нетрансгенна лінія 3S0057 цукрового буряку була використана як контроль. На додаток до цього, лінії 5R7150, 8K1180 і 6S0085 цукрового буряку були використані як негативний контроль. Ці лінії є звичайними нетрансгенними лініями, що застосовуються для селекції звичайного цукрового буряку.

Для трансформації були застосовані еталонні речовини, що відповідають плазміді PV-BVGT08. Плазмідну ДНК і ДНК контрольної лінії цукрового буряку змішували, розщеплювали рестриктазою і відділяли електрофорезом у гелі агарози паралельно з експериментальними речовинами. Згадану плазмідну ДНК використовували як маркер розміру очікуваного фрагменту та як позитивний гібридаційний контроль. Плазмідну ДНК змішували з геномною ДНК рослин із концентрацією, що представляла менше 1 копії елемента, що піддавався аналізу, для демонстрації чутливості саузерн-блотингу (-10мкг геномної ДНК і ~28пг ДНК PV-BVGT08). Для визначення розміру застосовували маркер молекулярного розміру RAOUL™ (ONCOR/Appligene, номер за каталогом 160673).

Виділення ДНК:

Рослинну тканину (від 1г до 3г сирової маси) з партії №74903H події H7-1 подрібнювали у рідкому азоті до стану тонкоподрібненого порошку за допомогою ступки та товкачика. Одержаний порошок переносили до 50мл пробірки (Oakridge) і додавали 7,5мл попередньо підігрітого (60°C) СТАВ-буфера (2% СТАВ, 100мМ трис-HCl, 20мМ EDTA (pH8,0), 1,4М NaCl і 0,2% меркаптоетанолу). Зразки інкубували при температурі 65°C впродовж приблизно 30хв. із періодичним перемішуванням. До зразків додавали однаковий об'єм (8мл) суміші хлороформу:ізоамілового спирту (24:1 у об'ємному відношенні, кімнатна температура). Суспензію перемішували шляхом перевертання пробірки, і дві фази відділяли центрифугуванням (10хв., 9000об/хв.). Водну фазу переносили до нової 50мл пробірки (Oakridge) з подальшим осадженням ДНК шляхом додання 5мл ізопропанолу. ДНК осаджували центрифугуванням (2хв., 9000об/хв.), і супернатант видаляли. Осаджену ДНК інкубували з промивним розчином (76% етанол і 10мМ амонію ацетат) впродовж приблизно 20хв. Після центрифугування та декантації супернатанту, ДНК піддавали сушінню під вакуумом і повторно розчиняли у TE (pH8,0) при температурі 4°C впродовж ночі.

Як альтернативний метод, ДНК виділяли за допомогою набору DNeasy Plant Maxi Kit від фірми Qiagen (Dusseldorf, Німеччина, номер за каталогом 68163). Виділення ДНК здійснювали за інструкцією виробника.

Як додатковий альтернативний метод, ДНК виділяли за допомогою набору DNeasy Plant Mini Kit від фірми Qiagen (Dusseldorf, Німеччина, номер за каталогом 69103). Виділення ДНК здійснювали за інструкцією виробника.

Кількісне визначення і розщеплення ДНК рестриктазами:

Кількісне визначення ДНК здійснювали за допомогою спектрофотометра LKB Biochrom (УФ/видима частина спектру) (Amersham Pharmacia, Freiburg, Німеччина) або, за альтернативним варіантом, кількісне визначення ДНК здійснювали після електрофорезу у гелі агарози шляхом сканування ДНК за допомогою програми RELPscan (MWG-Biotech, Ebersberg, Німеччина). Як калібраційний стандарт, було застосовано набір High DNA Mass Ladder від фірми Gibco/Life Technologies (Karlsruhe, Німеччина) (номер за каталогом 10496-016). Рестриктази одержували від фірми Boehringer Mannheim (Mannheim, Німеччина), від фірми Stratagene (Amsterdam, Нідерланди) або від фірми New England Biolabs (Frankfurt, Німеччина) і застосовували за інструкцією виробника.

Одержання ДНК-зондів:

ДНК PV-BVGT08 виділяли з культур E.coli. Матриці зондів, гомологічні кодувальній ділянці CP4-EPSPS, 35S-промотору, ділянці поліаденілування E9-3', касеті ³⁵S-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3' і основним ділянкам, одержували шляхом розщеплення відповідними рестриктазами з подальшим відділенням шляхом електрофорезу у гелі агарози або полімеразно-ланцюговою реакцією. Одержані продукти очищали за допомогою набору Gene Clean II Kit від фірми BIO 101 (La Jolla, Каліфорнія). Мічення зондів (25пг) ³²P-dCTP або ³²P-dATP здійснювали за допомогою системи мічення ДНК Megaprime™ від фірми Amersham-Pharmacia Biotech Europe (Freiburg, Німеччина).

Саузерн-блотинг:

Зразки ДНК, оброблені рестриктазами, відділяли шляхом електрофорезу у гелі агарози впродовж ~15год. при ~35В. Після фотографування гелю, ДНК депуринізували шляхом просочення гелю впродовж 15хв. у 0,25 М розчині HCl, денатурували шляхом інкубування гелю впродовж 30хв. у денатураційному розчині (0,5М NaOH, 1,5М NaCl) із постійним обережним перемішуванням і, в решті-решт, нейтралізували шляхом просочення впродовж 2год. у декількох об'ємах розчину (2М NaCl і 1М трис-HCl, pH5,5). ДНК із гелів агарози переносили на нейлонові мембрани Hybond-N™ (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Німеччина) за

допомогою блотера PosiBlot Pressure Blotter від фірми Stratagene за методикою виробника. Після просочення фільтра впродовж 15хв. у 2×SSPE (20×SSPE: 3,6М NaCl, 20мМ EDTA, 0,2М NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH7,4), ДНК фіксували на мембрані шляхом освітлення УФ-випромінювання (Transilluminator Pharmacia, Freiburg, Німеччина) впродовж 0,1хв. і нагрівання у вакуумній печі впродовж 1год. при температурі 80°C. Блоти піддавали попередній гібридизації впродовж 4год. у водному розчині 50% формаміду, 5×SSC, 0,1% лаурилсаркозину, 0,2% SDS та 2% блокувального реактиву (Boehringer Mannheim, Німеччина, номер за каталогом 1096176). Гібридизацію із зондом, міченим радіоактивною міткою, здійснювали у свіжому розчині для попередньої гібридизації впродовж 16-18год. при температурі 42°C. Після гібридизації мембрани промивали впродовж 5хв. у 2×SSC при температурі 42°C, впродовж 20хв. у 2×SSC, 1% SDS при температурі 65°C і впродовж двох періодів тривалістю 15хв. у 0,2×SSC, 0,1% SDS при температурі 68°C. Авторадіографічні зображення блотів одержали шляхом експонування блотів із застосуванням плівки Kodak Biomax MST™ у поєднанні з підсилювальним екраном Kodak Biomax MS™.

Ідентифікація 5' і 3' геномних Фланкуючих послідовностей:

Зчленування трансгена з геномною ДНК рослини ідентифікували за допомогою зворотної полімеразно-ланцюгової реакції. Геномну ДНК очищали як описано вище. Приблизно 1мкг ДНК розщеплювали у окремих реакціях рестрикційними нуклеазами TaqI, AluI, NdeII або RsaI. Фрагменти розщепленої ДНК повторно літували Т4-лігазою впродовж ночі з подальшим проведенням полімеразно-ланцюгової реакції. За допомогою програми аналізу праймерів OLIGO® від фірми NBI (National Biosciences, Inc., Plymouth, Мічиган) одержали різні комбінації зворотних праймерів.

Фрагменти, одержані шляхом ампліфікації за допомогою зворотної полімеразно-ланцюгової реакції, відділяли електрофорезом у гелі, вирізали з гелю і очищали за допомогою набору Gene Clean II™. Очищені фрагменти клонували у векторі pCR®2.1 за допомогою набору для клонування TOPO™TA cloning® Kit від фірми Invitrogen (Groningen, Нідерланди). Інсерційні сегменти піддавали секвенуванню за допомогою MWG-Biotech (Ebersberg, Німеччина). Аналіз одержаних даних секвенування здійснювали за допомогою програми для аналізу ДНК Mac Molly® Tetra DNA analysis software (Soft Gene GmbH, Bochold, Німеччина).

Аналіз за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції:

Геномну ДНК одержали за допомогою набору Plant DNAeasy Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Німеччина) за інструкціями виробника. Приблизно 50нг геномної ДНК було використано для проведення полімеразно-ланцюгової реакції. Реакційні суміші піддавали обробці при температурі 95°C впродовж 30с, 55°C впродовж 30с і 72°C впродовж 2хв. впродовж 35 циклів. Полімеразно-ланцюгові реакції здійснювали у термоблоці для проведення реакцій PTC200 cyclor (Biozym, Oldendorf, Німеччина). Продукти полімеразно-ланцюгових реакцій аналізували шляхом електрофорезу у гелі агарози.

1. Кількість інсерційних сегментів:

Для Н7-1 визначали кількість інсерційних сегментів, тобто кількість сайтів інтеграції трансгенної ДНК до геному цукрового буряку. Для визначення кількості інсерційних сегментів, геномну ДНК розщеплювали рестриктазами HindIII, XbaI і BamHI. Як негативний контроль, ДНК нетрансформованої контрольної рослини, що представляла той самий генетичний фон, розщеплювали за допомогою HindIII. Як позитивний контроль було застосовано ДНК трансформаційного вектора (PV-BVGT08).

XbaI і BamHI здійснюють розщеплення PV-BVGT08 лише один раз і не здійснюють розщеплення усередині міченого зонда CP4-EPSPS, що застосовувався (дивись Фіг.4). HindIII розщеплює PV-BVGT08 тричі, але усі три сайти знаходяться за межами зонда і на тому самому боці, 5', відносно зонда. Таким чином, кожен фермент повинен вивільнити один фрагмент ДНК, який буде гібридуватися із зондом CP4-EPSPS і буде містити частину ДНК-вставки і прилеглу геномну ДНК рослини. Кількість виявлених фрагментів вказує на кількість інсерційних сегментів, присутніх у події. Результати представлені на Фіг.5.

Після розщеплення ферментами HindIII, XbaI або BamHI, було виявлено лише один гібридизаційний фрагмент, відповідно. Фрагменти довжиною 5,2тис.п.н. унаслідок розщеплення HindIII (стовпчик 4), 4тис.п.н. унаслідок розщеплення XbaI (стовпчик 5) і приблизно 11тис.п.н. унаслідок розщеплення BamHI (стовпчик 7) показали, що трансформант Н7-1 представляє собою одну інтеграційну подію (Фіг.4). Сильний сигнал у стовпчику 1 представляє лінеаризовану плазмиду PV-BVGT08. Додаткові слабкі сигнали мають відношення до невеликих кількостей нерозщепленого PV-BVGT08 або до неспецифічних гібридизаційних фонових сигналів.

2. Кількість копій

Теоретично, один інтеграційний сайт може складатись із більше ніж однієї копії ДНК-вставки. Однак це було неможливим унаслідок розміру фрагментів за даними рестрикційного аналізу, наведеними вище. Якщо б у Н7-1 було більше однієї копії ДНК-вставки, були б виявлені додаткові фрагменти. Це було підтверджено також шляхом розщеплення рестриктазою PstI. PstI здійснює подвійне розщеплення у межах лівої та правої граничних послідовностей. Один із рестрикційних сайтів знаходиться у межах кодувальної ділянки CP4-EPSPS, завдяки чому після розщеплення із зондом CP4-EPSPS можна було б очікувати два гібридизаційні фрагменти. Один з очікуваних фрагментів відповідає внутрішньому фрагменту довжиною приблизно 1,2тис.п.н. Другий фрагмент повинен бути граничним фрагментом. Знову ж таки, якби існувало більше однієї копії, повинні були б виявитись додаткові фрагменти. Однак результати показують, що PstI розрізає ДНК, як очікувалось. Було виявлено внутрішній фрагмент довжиною 1,2тис.п.н. і лише один додатковий фрагмент довжиною приблизно 4,9тис.п.н. (Фіг.5: стовпчик 3, Фіг.4).

Як додатковий внутрішній контроль, ДНК розщеплювали за допомогою ClaI (Фіг.5: стовпчик 6, Фіг.4). Як очікувалось, гібридувався один фрагмент довжиною 2,4тис.п.н., оскільки ClaI здійснює розщеплення двічі, але за лівою та правою межами фрагменту CP4-EPSPS, що застосовувався. Цей результат також є доказом цілісності інтегрованого фрагменту ДНК і узгоджується з наведеними нижче результатами.

Наслідком гібридизації плазмиди PV-BVGT08 із фрагментом CP4-EPSPS став, як очікувалось, сигнал довжиною 8,6тис.п.н. (Фіг.5: стовпчик 1) (PV-BVGT08=8590п.н.). Друга менша дуже слабка смуга обумовлена неповною рестрикцією PV-BVGT08.

У цілому, експерименти показують, що трансформована лінія Н7-1 цукрового буряку містить у рослинному

геномі одноколіїну інтеграцію матричної ДНК PV-BVGT08.

3. Цілісність кодувальних ділянок:

Цілісність касети гена CP4-EPSPS відносно окремих елементів (промотор pFMV, кодувальна ділянка ctp2-CP4-EPSPS і нетрансльована ділянка E9-3') визначали шляхом розщеплення ферментами HindIII для pFMV, HindIII плюс BamHI для ctp2-CP4-EPSPS і EcoRI плюс PstI для нетрансльованої ділянки E9-3'. Додаткові експерименти були проведені з SacI плюс XhoI для ділянки pFMV-ctp2-CP4-EPSPS і для ділянки E9-3'. Плазмідну ДНК, змішану з нетрансгенною ДНК цукрового буряку і саму нетрансгенну ДНК цукрового буряку розщеплювали тими самими ферментами, як позитивні і негативні контролю, відповідно.

Ці ферменти розщеплюють у межах передбачуваної ДНК-вставки, між правою та лівою межами матричної ДНК (дивись плазмідну карту на Fig.1), тому, якщо відповідні елементи є інтактними, розмір гібридизованих фрагментів у ДНК H7-1 і ДНК PV-BVGT08 повинен бути ідентичним.

Як додатковий контроль, ДНК розщеплювали за допомогою XbaI. XbaI здійснює одне розщеплення між промотором та кодувальною ділянкою ctp2-CP4-EPSPS. Таким чином, можна очікувати фрагмент довжиною 8,6тис.п.н. у разі ДНК PV-BVGT08 і, у разі H7-1, граничний фрагмент, який різниться за розміром, порівняно з фрагментом PV-BVGT08. Результати показані на Fig.6, 7 і 8.

Fig.6. Шляхом розщеплення HindIII і BamIII вивільнили ген CP4-EPSPS і блот зондували фрагментом CP4-EPSPS, який одержали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції. Негативний контроль (стовпчик 6) не показав жодної гібридизаційної смуги. Як геномна ДНК події H7-1, так і плазміда PV-BVGT08, змішана з нетрансгенною ДНК, продукували фрагмент довжиною приблизно 1,7тис.п.н., який відповідає очікуваному розміру. Наслідком розщеплення XbaI був очікуваний фрагмент довжиною 8,6тис.п.н. лінеаризованого PV-BVGT08. Для події H7-1, наслідком розщеплення виявився граничний фрагмент довжиною приблизно 4,0тис.п.н. (дивись також Fig.4 і 5). І знову ж таки, негативний контроль не показав жодного сигналу.

Fig.7. Шляхом розщеплення HindIII вивільнили промотор вірусу мозаїки ранника і блот зондували фрагментом промотору, який одержали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції. Негативний контроль (стовпчик 5) не показав жодного гібридизаційного сигналу. Як геномна ДНК події H7-1, так і плазміда PV-BVGT08, змішана з нетрансгенною ДНК, продукували фрагмент довжиною приблизно 0,6тис.п.н. Цей фрагмент відповідає очікуваному розміру (стовпчик 4 і 6) промотору.

Наслідком розщеплення XbaI був очікуваний фрагмент довжиною 8,6тис.п.н. лінеаризованого PV-BVGT08 і, для події H7-1, лівий граничний фрагмент довжиною приблизно 1,3тис.п.н. (стовпчик 1 і 3). Цей фрагмент довжиною 1,3тис.п.н. є також додатковим доказом того, що подія H7-1 містить лише одну копію трансгена. І знову ж таки, негативний контроль (стовпчик 2) не показав жодного сигналу.

Шляхом розщеплення SacI/XhoI вивільнили промотор разом із кодувальною ділянкою CP4-EPSPS і ділянкою поліаденілування. Наслідком гібридизації з касетою повний промотор-ctp2-CP4-EP8P8-сигнал поліаденілування (фрагмент Pmcl/XhoI) було одержання очікуваних фрагментів промотор-ctp2-CP4-EPSPS (2,3тис.п.н.) і сигналу поліаденілування (0,7тис.п.н.) як у разі ДНК PV-BVGT08, змішаної з нетрансгенною ДНК, так і геномної ДНК H7-1 (стовпчик 9 і 11).

Fig.8. Шляхом розщеплення PstI і EcoRI вивільнили сигнал поліаденілування E9-3', і блот зондували фрагментом сигналу поліаденілування. Негативний контроль (стовпчик 3) не показав жодної гібридизаційної смуги. Як плазміда PV-BVGT08, змішана з нетрансгенною ДНК, так і геномна ДНК події H7-1 продукували фрагмент довжиною приблизно 0,6тис.п.н., який відповідає очікуваному розміру. Наслідком розщеплення XbaI був очікуваний фрагмент довжиною 8,6тис.п.н. лінеаризованого PV-BVGT08 і, для події H7-1, граничний фрагмент довжиною приблизно 4,0тис.п.н.

Шляхом розщеплення PstI вивільнили сигнал поліаденілування E9-3' у поєднанні з частиною 3' (0,5тис.п.н.) кодувальної ділянки CP4-EPSPS. Одержаний фрагмент (1,2тис.п.н.) виявляли як очікуваний як з геномною ДНК H7-1, так і з ДНК PV-BVGT08.

Шляхом розщеплення HindIII одержали фрагмент (8,0тис.п.н.) лінеаризованого PV-BVGT08 мінус фрагмент промотору (стовпчик 13) і, у разі H7-1, граничний фрагмент довжиною 5,2тис.п.н. (стовпчик 11). Один фрагмент (5,2тис.п.н.) розщеплення HindIII і один фрагмент (4,0тис.п.н.) розщеплення XbaI також є додатковим доказом того, що подія H7-1 містить лише одну копію ДНК-вставки. І знову ж таки, негативні контролю не показали жодного сигналу.

У цілому, результати блотів доказують, що усі елементи перенесеної ДНК є інтактними і що подія H7-1 містить одну інтактну кодувальну ділянку CTP2-CP4-EPSPS з її регуляційними елементами, промотор pFMV і послідовність термінації транскрипції E9-3'.

4. Аналіз з метою виявлення основних фрагментів

Основна ділянка Ti-плазмиди визначається, як ділянка за межами матричної ДНК, обмежена лівою і правою граничними послідовностями, яка складається з огі генів і селекційних генів для бактеріальної реплікації і бактеріальної селекції і яка, як правило, не переноситься до рослинного геному *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією. Для підтвердження відсутності основної векторної ДНК у події H7-1, геномну ДНК H7-1 з нетрансформованого контролю і геномну ДНК H7-1, змішану з ДНК PV-BVGT08, розщеплювали рестриктазою XbaI і зондували трьома зондами, що перекриваються, які одержали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції, що охоплювали основну послідовність у цілому. Четвертий зонд складається з цілого остову у одному фрагменті.

Зонди, що застосовувались, представляють основну послідовність (дивись Fig.9):

1: 2730-5370п.н.

2: 5278-6419п.н.

3: 6302-7851п.н.

4: 2730-7851п.н.

Fig.10 показує результати саузерн-блотингу. Стівпчики 6, 10, 14 і 18: гідролізат геномної ДНК H7-1, зондований основними фрагментами цілого остову, не показав жодної гібридизаційної смуги. Лише стівпчики 4, 8, 12, 16 і 20: геномна ДНК H7-1, змішана з ДНК PV-BVGT08, показала смуги 8,6тис.п.н., як очікувалось.

Згадані смуги представляють лінеаризовану ДНК PV-BVGT08.

Стовпчики 2 і 4: геномна ДНК Н7-1 і геномна ДНК Н7-1, змішана з PV-BVGT08, гібридизовані з фрагментом CP4-EPSPS, показали гібридизаційні сигнали. Смуга 4тис.п.н. у стовпчику 2 представляє правий граничний фрагмент, дві смуги стовпчика 4 представляють знову ж таки правий граничний фрагмент (4,0тис.п.н.) і лінеаризовану плазмиду PV-BVGT08 (8,6тис.п.н.). Обидві смуги мають однакову інтенсивність. Це чітко вказує на те, що концентрація доданої ДНК PV-BVGT08 є порівнянною з концентрацією елементу CP4-EPSPS у ДНК Н7-1. Концентрація застосованої плазмідної ДНК є еквівалентною 0,5 копії. Якби до геному Н7-1 були інтегровані основні послідовності, були б виявлені чіткі сигнали.

Ці результати підтверджують, що Н7-1 не містить жодної основної послідовності, що виявляється, тієї плазмиди, яка була застосована для трансформації. Ці результати були також підтверджені даними аналізу 5' і 3' геномних фланкуючих ділянок (дивись нижче).

5. Ідентифікація 5' і 3' геномних фланкуючих послідовностей

Агробасієrium-опосередкована трансформація, як правило, веде до інтеграції усіх послідовностей до рослинного геному між лівою і правою границями. 5' і 3' кінцеві ділянки інтегрованої плазмідної ДНК повинні знаходитись у межах або поблизу від лівої або правої граничної послідовностей, відповідно. Таким чином, для ідентифікації цих ділянок було застосовано зворотну полімеразно-ланцюгову реакцію. Клоновані продукти полімеразно-ланцюгової реакції секвенували і дані секвенування порівнювали з послідовністю PV-BVGT08.

Фіг.11 показує порівняльний аналіз послідовності фрагменту, клонованого за допомогою зворотної полімеразно-ланцюгової реакції (D1U.RPT) (=геном Н7-1, верхня послідовність), одержаної з праймерами для аналізу лівої граничної ділянки, з послідовністю PV-BVGT08 (нижня послідовність). Порівняння обох послідовностей показало, що гомологія припинялась точно у межах граничної послідовності.

Фіг.12 показує порівняльний аналіз послідовності фрагменту, клонованого за допомогою зворотної полімеразно-ланцюгової реакції (B3UNI.RPT) (=геном Н7-1, верхня послідовність), одержаної з праймерами для аналізу правої граничної ділянки, з послідовністю PV-BVGT08 (нижня послідовність). Порівняння обох послідовностей показало, що гомологія припинялась вже за 18 нуклеотидів перед граничною послідовністю.

В цілому, це є чітким підтвердженням правильної інтеграції згаданої послідовності між лівою та правою межами Ті-плазмиди PV-BVGT08. Послідовність припинялась всередині або безпосередньо перед межами. Ці дані підтверджують результати основного аналізу, які полягали у тому, що до геному Н7-1 за межами граничних ділянок не були інтегровані жодні послідовності остову.

Для визначення того, чи є фланкуючі послідовності на правому або лівому боці інсерційного сегменту події Н7-1 цукрового буряку інтактними рослинними геномними послідовностями, здійснили зворотну полімеразно-ланцюгову реакцію з комбінаціями праймерів Р1, Р2, Р3 і Р4.

Праймери комбінацій праймерів Р1 і Р2 знаходяться за межами інсерційного сегменту. Якщо ДНК інсерційного локусу у межах події Н7-1 є ідентичною ДНК нетрансформованого контролю, наслідком полімеразно-ланцюгової реакції повинні бути два PCR-фрагменти, що представляють результат синтезу двох комбінацій праймерів. Праймери комбінацій праймерів Р3 і Р4 конструювались таким чином, що один із відповідних праймерів знаходиться усередині інсерційного сегменту CP4-EPSPS, а другий праймер знаходиться за межами згаданого інсерційного сегменту, у межах геномної ДНК рослини. Завдяки цьому, полімеразно-ланцюгова реакція повинна дати фрагменти лише ДНК події Н7-1.

Дані секвенування зворотною полімеразно-ланцюговою реакцією у поєднанні з даними вектора PV-BVGT08 дають послідовність, що включає інсерційний сегмент Н7-1 (послідовність PV-BVGT08), праву та ліву ділянки зчленування і додаткову ДНК цукрового буряку (Послідовність №5).

Для ідентифікації зчленувань трансгена з геномною ДНК рослини (ідентифікація специфічності події) і ділянок геномної ДНК з лівого та правого боків інсерційного сегменту, були застосовані такі комбінації праймерів:

Комбінація Р1 (праймер для аналізу геномної ДНК за межами правої граничної ділянки, Послідовність №18, Послідовність №19):

Верхній праймер: 5' CGG TAA ATG CAT TGG CCT TTG TT

Нижній праймер: 5' CAC CCA GAT CCC AAT AAA ACC GTA AT

Очікуваний продукт полімеразно-ланцюгової реакції: 241п.н.

Комбінація Р2 (праймер для аналізу геномної ДНК за межами лівої граничної ділянки, Послідовність №20, Послідовність №21):

Верхній праймер: 5' AAA TGG TTG TAG ATA AAT AAG GAA ATC A

Нижній праймер: 5' ACA TGT TTG AGC ACT CTT CTT GT

Очікуваний продукт полімеразно-ланцюгової реакції: 377п.н.

Комбінація Р3 (праймер для аналізу зчленування трансгена з геномною ДНК рослини, Послідовність №7, Послідовність №8):

Верхній праймер: 5' ATG CAT TGG CCT TTG TTT TTG AT

Нижній праймер: 5' TGT CGT TTC CCG CCT TCA G

Очікуваний продукт полімеразно-ланцюгової реакції: 288п.н. (Послідовність №11).

Комбінація Р4 (праймер для аналізу зчленування трансгена з геномною ДНК рослини, Послідовність №9, Послідовність №10):

Верхній праймер: 5' CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TGA AT

Нижній праймер: 5' AGT TAA CTT TCC ACT TAT CGG GGC ACT G

Очікуваний продукт полімеразно-ланцюгової реакції: 751п.н. (Послідовність №12).

При проведенні експериментів із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції з ДНК події Н7-1 і з ДНК нетрансгенної контрольної рослини із застосуванням комбінації праймерів Р3, одержали лише фрагмент ДНК події Н7-1. У протилежність до цього, при проведенні експериментів із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції з комбінацією праймерів Р1, гомологічними послідовностям за межами інсерційного сегменту, одержали фрагменти як ДНК події Н7-1, так і нетрансгенної контрольної ДНК. Дивись ці результати на Фіг.13.

Результати вказують на те, що послідовність, що знаходиться поряд із правим зчленуванням інсерційного сегменту, є присутньою у трансгенній ДНК події Н7-1 і у ДНК нетрансгенних рослин. Можна зробити висновок, що ця ДНК, за межами інсерційного сегменту події Н7-1, є нетрансгенною геномною ДНК.

При проведенні експериментів із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції з ДНК події Н7-1 і з ДНК нетрансгенної контрольної рослини із застосуванням комбінації праймерів Р4, яка має один із праймерів, розміщений всередині інсерційного сегменту CP4-EPSPS, одержали лише фрагмент ДНК події Н7-1. У протилежність до цього, при проведенні експериментів із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції з комбінацією праймерів Р2, гомологічною послідовностям за межами інсерційного сегменту, одержали фрагменти як ДНК події Н7-1, так і нетрансгенної контрольної ДНК (Фіг.14).

Результати вказують на те, що послідовність, що знаходиться поряд із лівим зчленуванням інсерційного сегменту, є присутньою як у трансгенній ДНК події Н7-1, так і у ДНК нетрансгенних рослин. Можна зробити висновок, що ця ДНК, за межами лівого зчленування, є нетрансгенною геномною ДНК.

У цілому, можна стверджувати, що послідовності за межами інсерційного сегменту події Н7-1 цукрового буряку є ідентичними послідовностям, присутнім у нетрансгенних рослин. Можна зробити висновок, що ці послідовності є рослинними геномними послідовностями, присутніми в батьківській клітинній лінії, що застосовувалась для трансформації, та в інших звичайних лініях цукрового буряку.

6. Генерация стабільність

Для демонстрації стабільності інтегрованої ДНК, оригінальну трансформаційну подію Н7-1 порівнювали з трьома потомствами (64801Н, 74922Н і 83002S; дивись Фіг.15) цієї лінії, які одержали шляхом самозапилення нетрансгенних ліній цукрового буряку. Оригінальну трансформовану лінію і три потомства одержали у 1995, 1996, 1997 і 1998 роках.

Як контроль, аналізували чотири різні нетрансгенні лінії цукрового буряку (3S0057, 5R7150, 8K1180, 6S0085). Усі ДНК розщеплювали XbaI, HindIII і BamHI, відповідно, і гібридизували з міченим фрагментом CP4-EPSPS. Для демонстрації того, що уся матрична ДНК стабільно інтегрувалась до рослинного геному, усі стовпчики потомства Н7-1, розщеплені однаковою рестриктазою, повинні показати смугу однакового розміру.

ДНК потомства Н7-1 стовпчиків 3-6 показують очікувані фрагменти: ДНК, розщеплена BamHI, дала смуги приблизно 11 тис.п.н., ДНК, розщеплена XbaI, дала фрагменти довжиною 4,0 тис.п.н. і, у разі рестрикції HindIII, одержали смуги 5,2 тис.п.н. Усі смуги однієї рестрикції, але різних років, були ідентичними за своїм розміром. Усі нетрансгенні лінії не показали жодного сигналу (Фіг.16).

Ці результати показують, що введена послідовність стабільно інтегрується до геномної ДНК і стабільно успадковується.

СХЕМА ПОСЛІДОВНОСТЕЙ - довільний текст

ПОСЛІДОВНІСТЬ №5

<223> ДНК-вставка з 3' і 5' фланкуючими послідовностями

ПОСЛІДОВНІСТЬ №6

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

ПОСЛІДОВНІСТЬ №11

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

ПОСЛІДОВНІСТЬ №12

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

ПОСЛІДОВНІСТЬ №13

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

ПОСЛІДОВНІСТЬ №17

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> КВС СААТ АГ	
<120> Цукровий буряк, стійкий до гліфосату	
<130> РСТ 0079	
<150> ЕР 03003866.5	
<151> 2003-02-20	
<150> US 10/376763	
<151> 2003-02-28	
<160> 21	
<170> PatentIn version 3.1	
<210> 1	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 1	
ttaatttttg caggcgatgg tggctgttat	30
<210> 2	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 2	
catacgcatt agtgagtggg ctgtcaggac	30
<210> 3	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 3	
atgttatctt taccacagtt	20

<210> 4	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 4	
gtccctaataa gaaatacgtg aaac	24
<210> 5	
<211> 3778	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> ДНК-вставка з 3' і 5' фланкуючими послідовностями	
<400> 5	
ctcgagcggc cgccagtggt atggatatct gcagaattcg cccttatgtt atctttacca	60
cagtttgttg ctctgacaca accggtaaat gcattggcct ttgtttttga tggcatcaac	120
tttgagcat ctgattttgc atattcagcc tttccatgg taattctttt acaagaattt	180
tcattcttct ttaagtataa acacttagct tgggacaaac ttctgaccc atttcttaac	240
ttttgcaggt gatgggtggc gttatgagca tttgtgttt gatgtttctt tcttctcatt	300
acggttttat tgggacgtgg gtggctctaa ctatttaccat gacccctccg gcgtttgctg	360
aaggcgggaa acgacaatct gatcccccac aagcttgagc tcaggattta gcagatttcc	420
agattgggtt caatcaacaa ggtacgagcc atatcacttt attcaaatg gtatcgccaa	480
aaccaagaag gaactcccat cctcaaaagt ttgtaaggaa gaattctcag tccaaagcct	540
caacaaggtc aggttacaga gtctccaaac cattagccaa aagctacagg agatcaatga	600
agaatcttca atcaaagtaa actactgttc cagcacatgc atcatgggtca gtaagtttca	660
gaaaaagaca tccaccgaag acttaaaagt agtgggcac ttgtaaagta atcttgtcaa	720
catcgagcag ctggcttggt gggaccagac aaaaaaggaa tggtcagaa ttgttaggcg	780
cacctacca aagcatcttt gcccttattg caaagataaa gcagattcct ctagtacaag	840
tggggaacaa aataacgtgg aaaagagctg tctgacagc ccactcacta atgcgtatga	900
cgaacgcagt gacgaccaca aaagaattcc ctctatataa gaaggcattc attccattt	960
gaaggatcat cagatactca accaatcctt ctagaagatc taagcttacc gataagcttg	1020
atgtaattgg aggaagatca aaattttcaa tccccattct tcgattgctt caattgaagt	1080
ttctccgatg gcgcaagtta gcagaatctg caatgggtg cagaacccat ctcttatctc	1140

caatctctcg aaatccagtc aacgcaaatt tcccttatcg gtttctctga agacgcagca	1200
gcatccacga gcttatccga ttctgtcgtc gtggggattg aagaagagtg ggaagacgtt	1260
aattggctct gagcttcgtc ctcttaaggt catgtcttct gtttcacagg cgtgcatgct	1320
tcacggtgca agcagccgtc cagcaactgc tcgtaagtc tctggtcttt ctggaaccgt	1380
ccgtattcca ggtgacaagt ctatctccca caggctcttc atgttggag gtctcgctag	1440
cggtgaaacc cgtatccagg gtcttttga aggtgaagat gttatcaaca ctggaaggc	1500
tatgcaagct atgggtgcca gaatccgtaa ggaaggatgat acttgatca ttgatggtgt	1560
tggtaacggt ggactccttg ctctgaggc tctctcgat ttcgtaacg ctgcaactgg	1620
ttgccgttg actatgggtc ttgttggtgt ttacgatttc gatagcatt tcattggtga	1680
cgttctctc actaagcgtc caatgggtcg tgtgtgaac ccacttcgcg aaatgggtgt	1740
gcagggaag tctgaagacg gtgatcgtct tccagttacc ttgcgtggac caaagactcc	1800
aacgccaatc acctacaggg tacctatggc ttccgctcaa gtgaagtccg ctgttctgt	1860
tgctggtctc aacaccccag gtatcaccac tgttatcgag ccaatcatga ctctgacca	1920
cactgaaaag atgcttcaag gttttggtgc taaccttacc gttgagactg atgctgacgg	1980
tgtcgtacc atccgtcttg aaggctgtgg taagctcacc ggtaagtga ttgatgttcc	2040
aggatgacca tctctactg ctctccatt ggttctgcc ttgttcttc caggtccga	2100
cgtcaccatc cttaacgttt tgatgaacce aaccgtact ggtctcatct tgactctga	2160
ggaaatgggt gccgacatcg aagtatcaa cccacgtctt gctggtggag aagacgtggc	2220
tgacttgcgt gttcgttctt ctactttgaa ggggttact gttccagaag accgtgctcc	2280
ttctatgac gacgagatc caattctgc tgttcagct gcattcgctg aagggtctad	2340
cgttatgaac ggtttggaag aatccgtgt taaggaaagc gaccgtcttt ctgctgcgc	2400
aaacggtctc aagctcaacg gtgttgattg cgaatgaagt gagattctc tcgtcgtgcg	2460
tggctgctct gacggaagg gtctcggtaa cgctcttga gcagctgtcg ctaccacct	2520
cgatcacctg atcgctatga gcttctctg tatgggtctc gtttctgaaa accctgttac	2580
tgttgatgat gctactatga tcgctactag ctccagag ttcatggatt tgatggctgg	2640
tcttggagct aagatgaac tctccgacac taaggctgct tgatgagctc aagaattcga	2700
gctcgggtacc ggatcctcta gctagagctt tcgttcgtat catcggttc gacaacgtc	2760
gtcaagtca atgcatcagt ttcatgctc acacaccaga atcctactga gtttgagtat	2820
tatggcattg ggaaaactgt ttttcttga ccatttgtg tgcctgtaatt ttactgtgtt	2880
ttttattcgg ttttctctat cgaactgtga aatggaaatg gatggagaag agttaatgaa	2940
tgatatggtc ctttgttca ttctcaaatt aatattattt gtttttctc ttatttgtt	3000
tgtgttgaat ttgaaattat aagagatatg caaacatttt gttttgagta aaaatgtgtc	3060
aaatcgtggc ctctaagac cgaagttaat atgaggagta aaacacttgt agttgtacca	3120
ttatgcttat tctactaggca acaaatatat ttccagacct agaaaagctg caaatgttac	3180

tgaatacaag tatgtcctct tgtgttttag-acatttatga actttccttt atgtaatttt	3240
ccagaatcct tgtcagattc taatcattgc ttataatta tagttatact catggatttg	3300
tagttgagta tgaataatatt tttaaatgca ttatatgact tgcraattga ttgacaacat	3360
gcatcaatcg acctgcagcc actcgaagcg gccgccactc gagtgggtggc cgcacatcgc	3420
gtgaagttc tcactaagc ccccatgttg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat	3480
ttccgaatta gaataatttg ttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg	3540
tcgtttatc aaaatgtact ttcattttat aataacgtcg cggacatcta catttttgaa	3600
ttgaaaaaaa ttgtaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct	3660
gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt gaatatatcc taagtaaaac	3720
ctcatagggt ttacgtattt catttaggga caaggcgcaa ttccagcaca ctggcggc	3778

<210> 6

<211> 3706

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

<400> 6

atgttatctt taccacagtt tgttgcctg acacaaccgg taaatgcatt ggcctttgtt	60
tttgatggca tcaactttgg agcatctgat ttgcatatt cagccttttc catggttaatt	120
cttttacaag aattttcatt ctttcttaag tataaacact tagcttgga caaacttctg	180
atcctatttc ttaatttttg caggtgatgg tggctgttat gagcattttg tgtttgatgt	240
ttctttcttc tcattacggt ttatttgga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc	300
tccgcgctt tgcgaagcg gggaaacgac aatcgtatcc ccatcaagct tgagctcagg	360
atttagcagc attccagatt gggttcaatc aacaaggtac gagccatata actttattca	420
aattggtatc gccaaaacca agaaggaact cccatcctca aaggtttgta aggaagaatt	480
ctcagtccaa agcctcaaca aggtcagggt acagagtctc caaaccatta gccaaaagct	540
acaggagatc aatgaagaat cttcaatcaa agtaaaactac tgttcagca catgcatcat	600
ggtcagtaag ttfcagaaaa agacatccac cgaagactta aagttagtgg gcacttttga	660
aagtaatctt gtcaacatcg agcagctggc ttgtggggac cagacaaaaa aggaatggtg	720
cagaattgtt aggcgcacct accaaaagca tctttgcctt tattgcaaag ataaagcaga	780
ttcctctagt acaagtgggg aacaaaataa cgtggaaaag agctgtcctg acagcccact	840
cactaatgcg tatgacgaac gcagtgcga ccacaaaaga attccctcta tataagaagg	900
cattcattcc catttgaagg atcatcagat actcaaccaa tcttctaga agatctaagc	960
ttatcgataa gcttgatgta attgaggaa gatcaaaatt ttcaatcccc attcttcgat	1020

tgcttcaatt gaagtttctc cgatggcgca agttagcaga atctgcaatg gtgtgcagaa	1080
cccatctctt atctccaatc tctcgaaatc cagtcaacgc aaatctccct tatcggtttc	1140
tctgaagacg cagcagcatc cacgagctta tccgatttcg tcgtcgtggg gattgaagaa	1200
gagtgggatg acgttaattg gctctgagct tcgtctctt aaggtcatgt ctctgtttc	1260
cacggcgtgc atgcttcacg gtgcaagcag ccgtccagca actgctcgta agtctctgg	1320
tctttctgga accgtccgta ttccaggtga caagtctatc tcccacaggt ccttcatgtt	1380
tggaggtctc gctagcggtg aaacccgtat caccggctct ttggaagggt aagatgttat	1440
caacactggt aaggctatgc aagctatggg tgccagaatc cgttaaggaag gtgatacttg	1500
gatcattgat ggtgttggtg acgggtggact ccttgctcct gaggtcctc tcgatttcgg	1560
taacgctgca actggtgcc gtttgactat gggctctgtt ggtgtttacg atttcgatag	1620
cactttcatt ggtgacgctt ctctactaa gcgtccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact	1680
tcgcgaaatg ggtgtgcagg tgaagtctga agacgggtat cgtcttcag ttacctgctg	1740
tggaccaaag actccaacgc caatcaccta cagggtacct atggcttcg ctcaagtga	1800
gtccgctgtt ctgcttgctg gtctcaacac ccaggtatc accactgtta tcgagccaat	1860
catgactcgt gaccacactg aaaagatgct tcaaggtttt ggtgctaacc ttaccgttga	1920
gactgatgcf gacgggtgtc gtaccatccg tcttgaaggt cgtggaagc tcaccgggtc	1980
agtattgat gttccagggt atccatcctc tactgtttc ccattggtg ctgccttct	2040
tgttcagggt tccgacgtca ccatccttaa cgttttgatg aaccaaccc gtactgtct	2100
catcttgact ctgcaggaaa tgggtgccga catcgaagt atcaaccac gtcttgctgg	2160
tggagaagac gtggctgact tgcgtgttcg ttctctact ttgaagggtg ttactgtcc	2220
agaagaccgt gctccttcta tgatcgacga gtatccaatt ctgctgttg cagctgcatt	2280
cgctgaaggt gctaccgtta tgaacgggtt ggaagaactc cgtgttaagg aaagcgaccg	2340
tctttctgct gtgcgaaacg gtctcaagct caacgggtt gattgcgatg aaggtgagac	2400
ttctctctc gtgcgtggtc gtctgacgg taagggtctc ggtaacgctt ctggagcagc	2460
tgtcgtacc cacctcgatc accgtatgc tatgagctc ctggttatgg gtctcgtttc	2520
tgaaaaccct gttactgttg atgatgtac tatgatcgt actagcttc cagagttcat	2580
ggatttgatg gctggctctg gagctaagat cgaactctc gacactaagg ctgcttgatg	2640
agctcaagaa ttcgagctcg gtaccggatc ctctagctag agcttctgtt cgtatcatcg	2700
gtttcgacaa cgttcgtaa gttcaatgca tcagtttcat tgcgcacaca ccagaatcct	2760
actgagtttg agtattatgg cattgggaaa actgttttc ttgtaccatt tgttgtctt	2820
gtaatttact gtgtttttta ttcggtttc gctatcgaac tgtgaaatgg aaatggatgg	2880
agaagagtta atgaatgata tggctcttt gtctattctc aaattaatat tattgtttt	2940
ttctcttatt tgttgtgtgt tgaatttgaa attataagag atatgcaaac atttgtttt	3000
gagtaaaaat gtgtcaaatc gtgcctcta atgaccgaag ttaatagag gagtaaaaca	3060

ctttagttg taccattatg cttattcact aggcaacaaa tatattttca gacctagaaa	3120
agctgcaaat gtactgaat acaagtatgt cctcttgtgt ttagacatt tatgaacttt	3180
cctttatgta atttccaga atccttgtca gattctaate attgctttat aattatagtt	3240
atactcatgg attttagtt gagtatgaaa atatttttta atgcatttta tgacttgcca	3300
attgattgac aacatgcac aatcgacctg cagccactcg aagcggccgc cactcgagtg	3360
gtggccgcat cgtcgtgaa gtttctcacc taagcccca ttggacgtg aatgtagaca	3420
cgtcgaaata aagatttccg aattagaata attgtttat tgctttcgcc tataaatagc	3480
aoggtatgta attgtcgtt ttatcaaat gtactttcat ttataataa cgctgcggac	3540
atctacattt tgaattgaa aaaaattggt aattactctt tctttttctc catattgacc	3600
atcactactca ttgctgatcc atgtagattt cccggacatg aagccattta caattgaata	3660
tatcctaagt aaaacctcat aggtttttacg tatttcattt agggac	3706
<210> 7	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 7	
atgcattggc cttgttttt gat	23
<210> 8	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 8	
tgctgtttcc cgccttcag	19
<210> 9	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 9	

cgctgaggac atctacattt ttgaat	26
<210> 10	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер i	
<400> 10	
agttaacttt ccacttatcg gggcactg	28
<210> 11	
<211> 288	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції	
<400> 11	
atgcattggc cttgttttt gatggcatca acthtggagc atctgatttt gcatattcag	60
ccctttccat ggtaattctt ttacaagaat ttccattctt tcttaagtat aaacacttag	120
cttgggacaa acttctgac ctatttctta attttgcag gcgatgggtg ctgttatgag	180
cattttgtgt ttgatgttc tctcttctca ttacggtttt attgggatct ggggtggcct	240
aactatttac atgagcctcc gcgcgtttgc tgaaggcggg aaacgaca	288
<210> 12	
<211> 751	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції	
<400> 12	
cgctgaggac atctacattt ttgaattgaa aaaaaattgg taattactct ttcttttct	60
ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt tcccggacat gaagccattt	120
acaattgaat atacctaag taaaacctca taggttttac gtatttcatt tagggactaa	180
aatggtttag gataattact ttagctaaca taagataata aataataaaa taaataaaaa	240
taaaatgggt gtagataaat aaggaaatca ataataata tgaagtgtgag tgataggacg	300
ggaatgggaa acitttacac tactttaacg ctattgaacg agtatgagta tgttataaac	360

gtaaaatgtt ttatgtgta gacaatggcc tcaagtgaat gtagccctat taatggagga	420
aatgcaaacc acgagtcctga ggtcacgctc gaagaaatga gggcaaggat cgacgcattg	480
cgtagcgacc ctgtttttgg agatgccacg ggagatgcta gtgataaccg aatggattta	540
atgaggttga tgaatgatga gcttttaca ggaatcgac aaaggcctag aactgaacaa	600
gaagagtgtc caaacatgtt caagagggtt tcggctcata agccccaac ttatgatgga	660
aagccagacc ccaatgagtt tgaagaatgg ctcaacggca tggaaaaatt gttcgtatgcc	720
acccagtgcc ccgataagtg gaaagttaac t	751

<210> 13

<211> 664

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції

<400> 13

ttaatttttg caggcgatgg tggctgttat gagcatttg tgttgatgt ttctctcttc	60
tcattacggt ttattggga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc tccgcgcgtt	120
tgctgaaggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct tgagctcagg atttagcagc	180
attccagatt gggttcaatc aacaaggtag gagccatctc actttattca aattggtatc	240
gccaaaacca agaaggaact cccatcctca aaggtttga aggaagaatt ctcagtccaa	300
agcctcaaca aggtcagggt acagagtctc caaacatta gccaaaagct acaggagatc	360
aatgaagaat cttcaatcaa agtaactac tgttccagca catgcatcat ggtagtaag	420
tttcagaaaa agacatccac cgaagactta aagttagtgg gcatcttga aagtaatctt	480
gtcaacatcg agcagctggc. ttgtggggac cagacaaaaa aggaatgggt cagaattgtt	540
aggcgcacct accaaaagca tctttgcctt tattgcaaag ataaagcaga ttctctagt	600
acaagtgggg aacaaaataa cgtggaaaag agctgtcctg acagcccact cactaatgcg	660
tatg	664

<210> 14

<211> 30

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

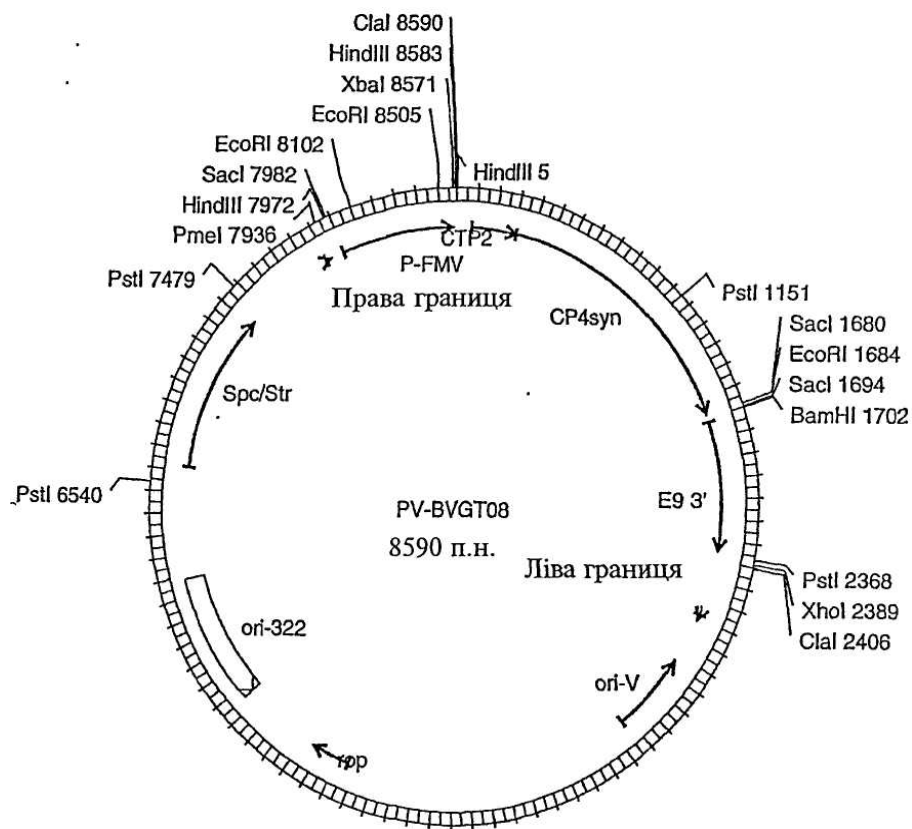
<223> Праймер

<400> 14

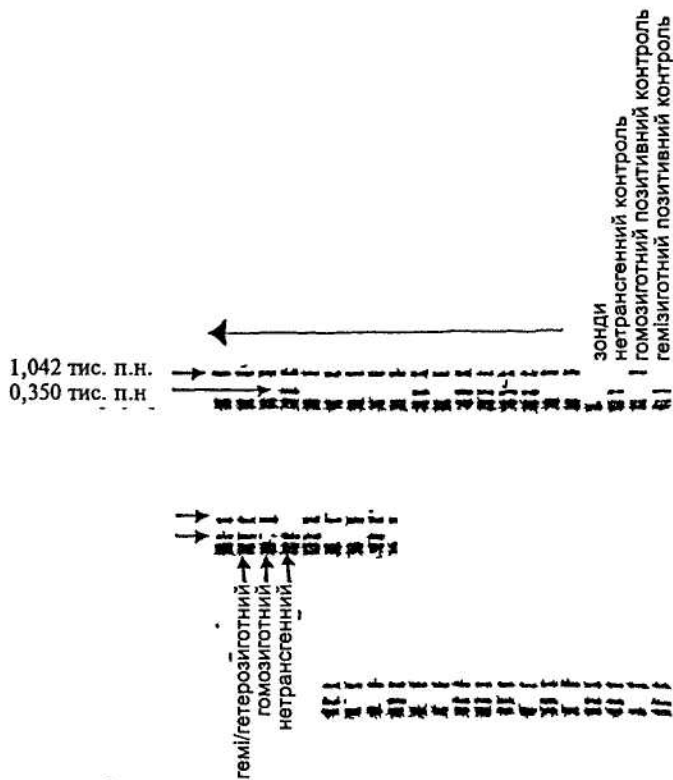
gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc	30
----------------------------------	----

<210> 15	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 15	
gacccatagt ttgattttaa gcacgacatg	30
<210> 16	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 16	
gcagattctg ctaacttgcg ccatcggag	29
<210> 17	
<211> 1042	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції	
<220>	
<221> misc_feature	
<223> Продукт полімеразно-ланцюгової реакції	
<400> 17	
gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc ttgtttttg atggcatcaa ctttggagca	60
tctgattttg catattcagc cttttccatg gtaattcttt tacaagaatt ttcattcttt	120
cttaagtata aacacttagc ttgggacaaa cttctgatcc tatttcttaa ttttgcagg	180
cgatgggtggc tgatatgagc attttgtgtt tgatgtttct ctcttctcat tacggtttta	240
ttgggatctg ggtggctcta actatttaca tgagcctccg cgcgtttgct gaaggcggga	300
aacgacaatc tgatcccat caagcttgag ctcaggattt agcagcattc cagattgggt	360
tcaatcaaca aggtacgagc catatcactt tattcaaatt ggtatcgcca aaaccaagaa	420
ggaactccca tctcaaaagg ttgttaagga agaattctca gtccaaagcc tcaacaaggt	480

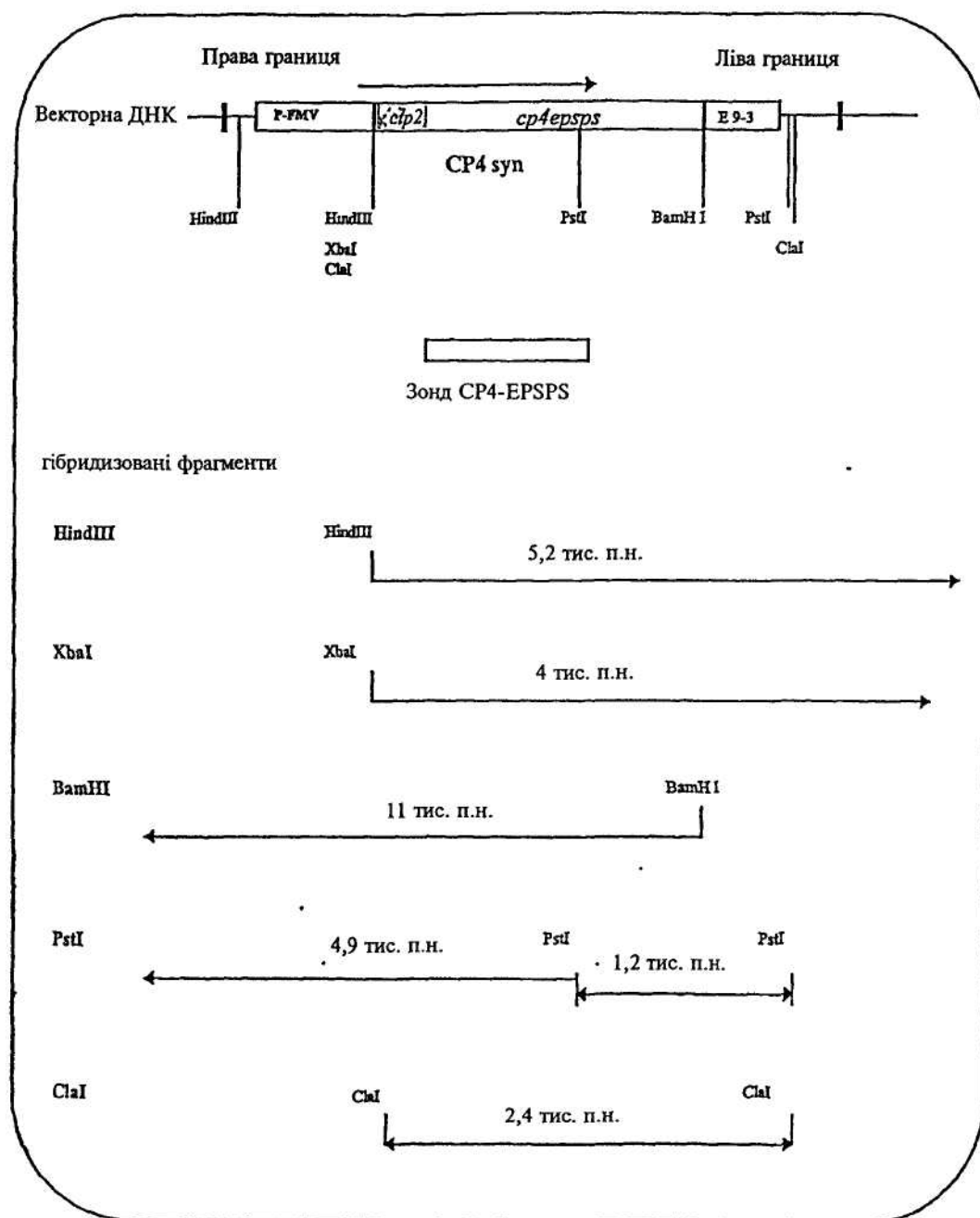
cagggtacag agtctccaaa ccattagcca aaagctacag gagatcaatg aagaatcttc	540
aatcaaagta aactactgtt ccagcacatg catcatggtc agtaagtttc agaaaaagac	600
atccaccgaa gacttaaagt tagtgggcat ctttgaaagt aatcttgtca acatcgagca	660
gctggcttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtcaga attgttaggc gcacctacca	720
aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc tctagtacaa gtggggaaca	780
aaataacgtg gaaaagagct gtcctgacag ccactcact aatgcgtatg acgaacgcag	840
tgacgaccac aaaagaattc cctctatata agaaggcatt cattcccatt tgaaggatca	900
tcagatactg aaccaatcct tctagaagat ctaagcttat cgataagctt gatgtaattg	960
gaggaagatc aaaattttca atccccattc ttcgattgct tcaattgaag ttctccgat	1020
ggcgcaagtt agcagaatct gc	1042
<210> 18	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 18	
cggtaatgc attggccttt gtt	23
<210> 19	
<211> 26	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 19	
сacccagatc cсаатаааас сgтаат	26
<210> 20	
<211> 28	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 20	
aaatggttgt agataaataa ggaaatca	28



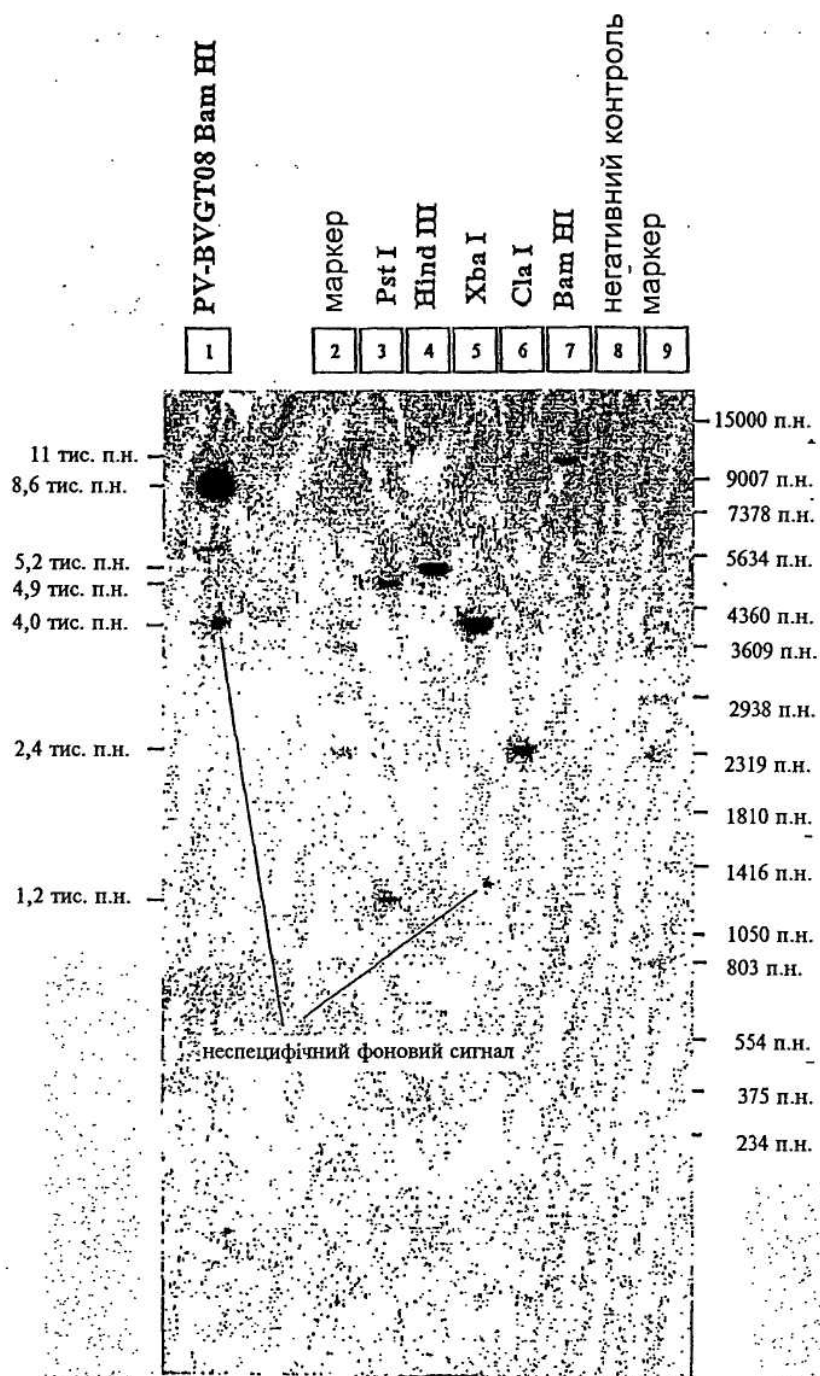
ФІГ. 1



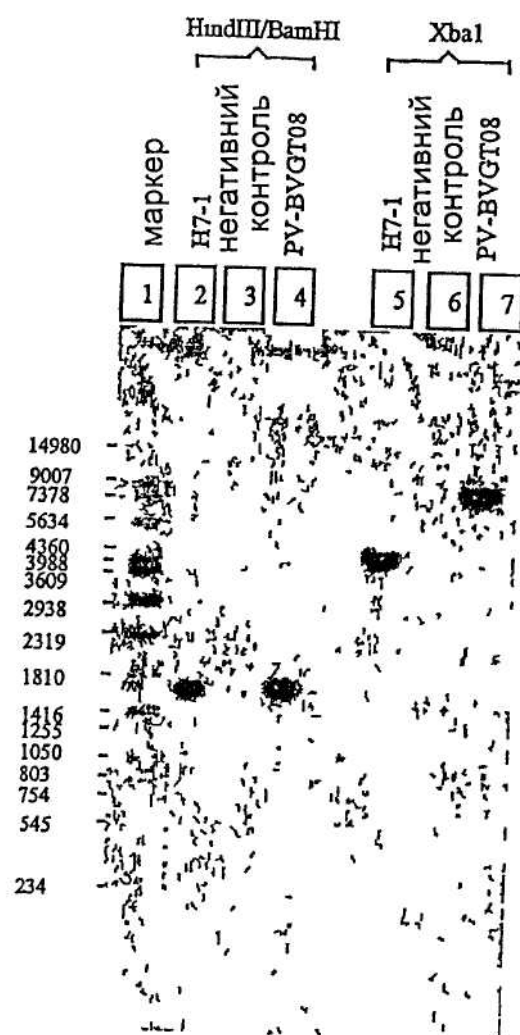
ФІГ. 3



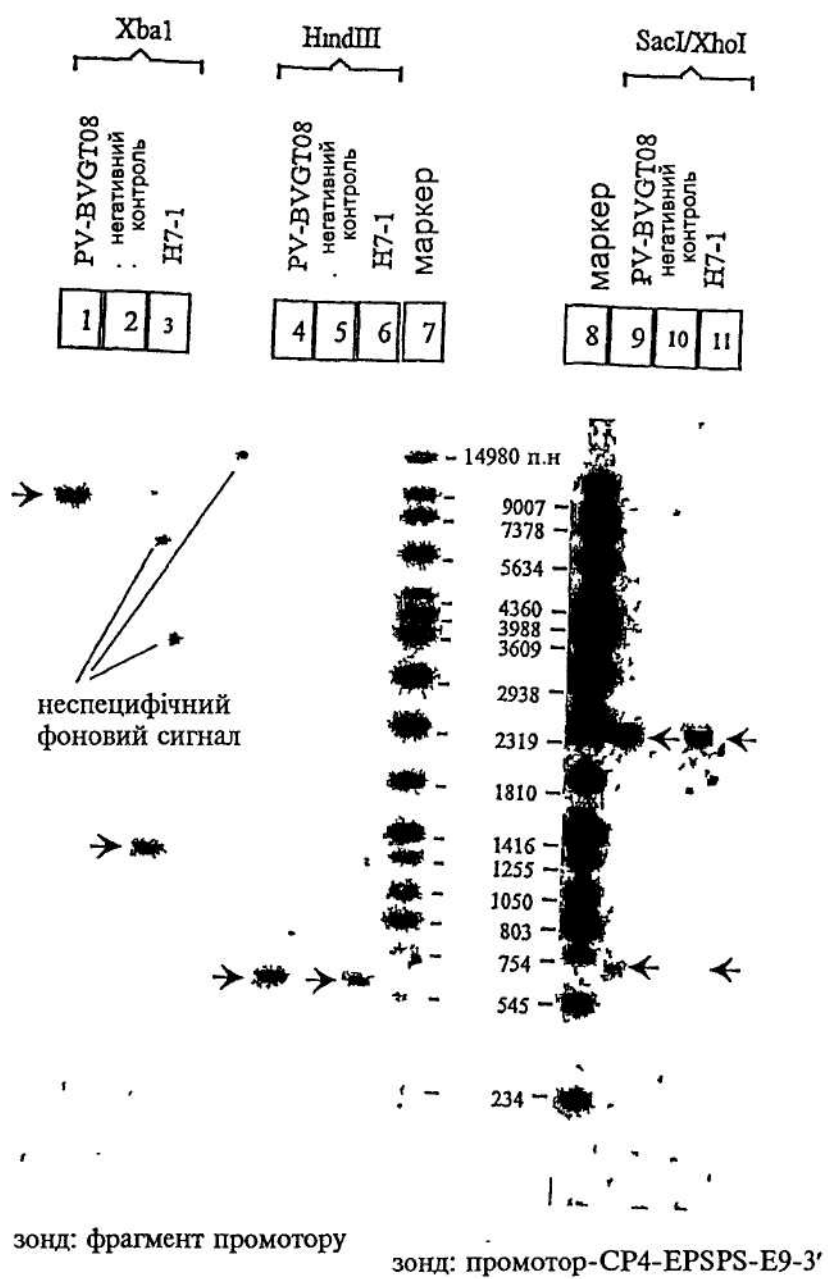
ФІГ. 4



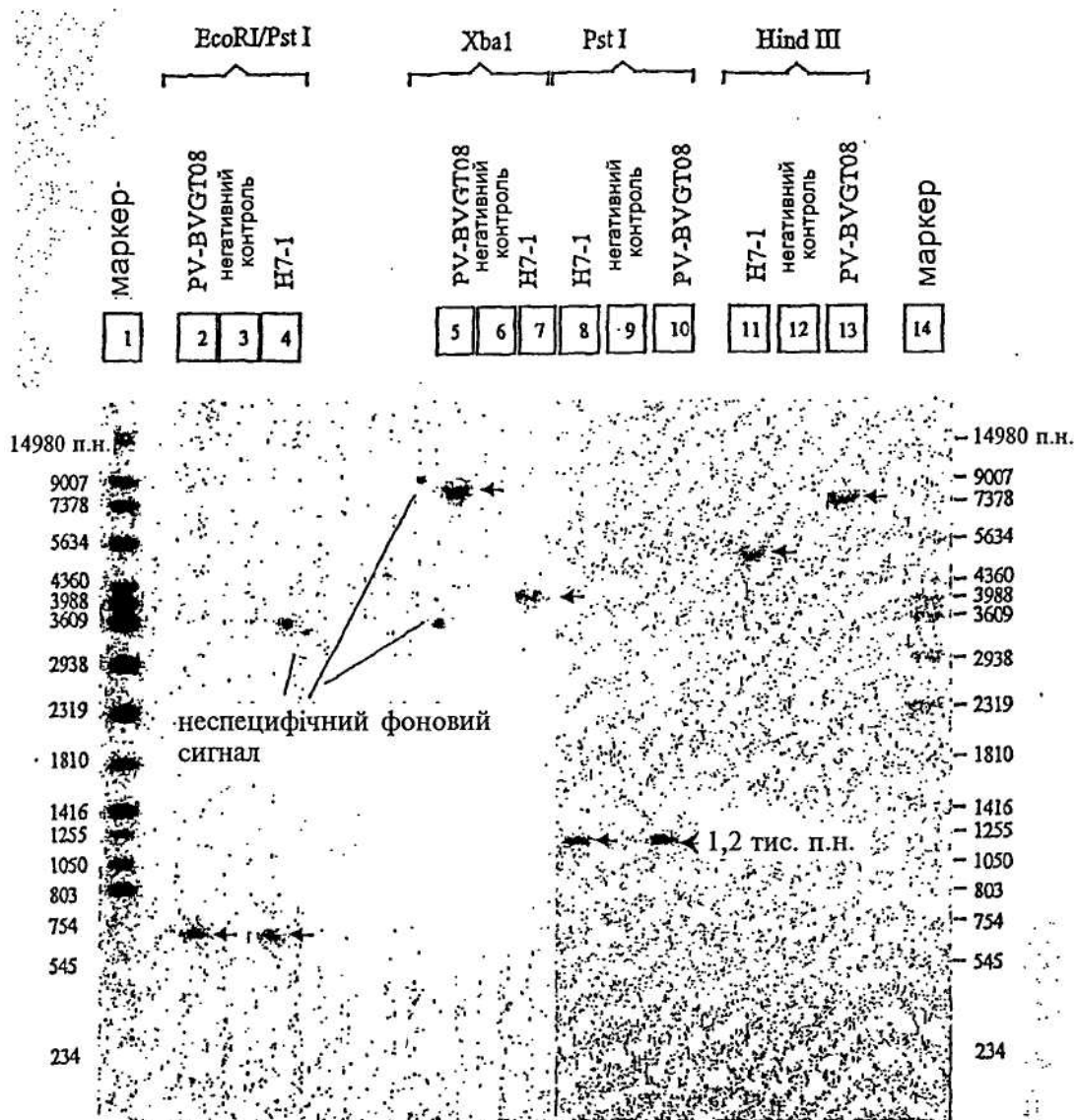
ФІГ. 5



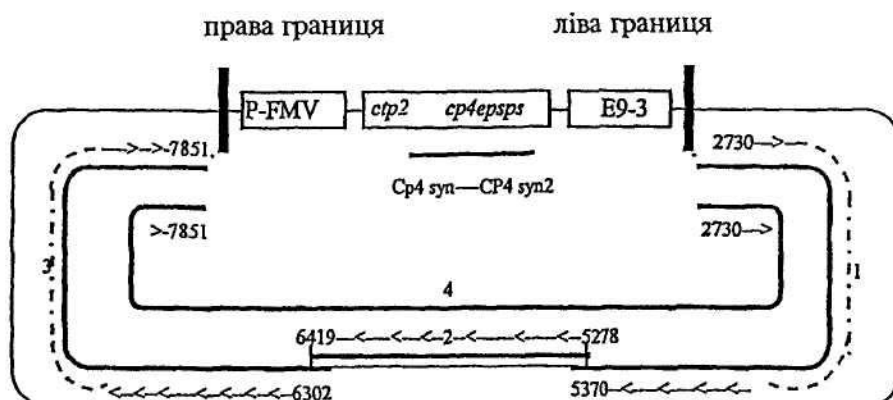
ФІГ. 6



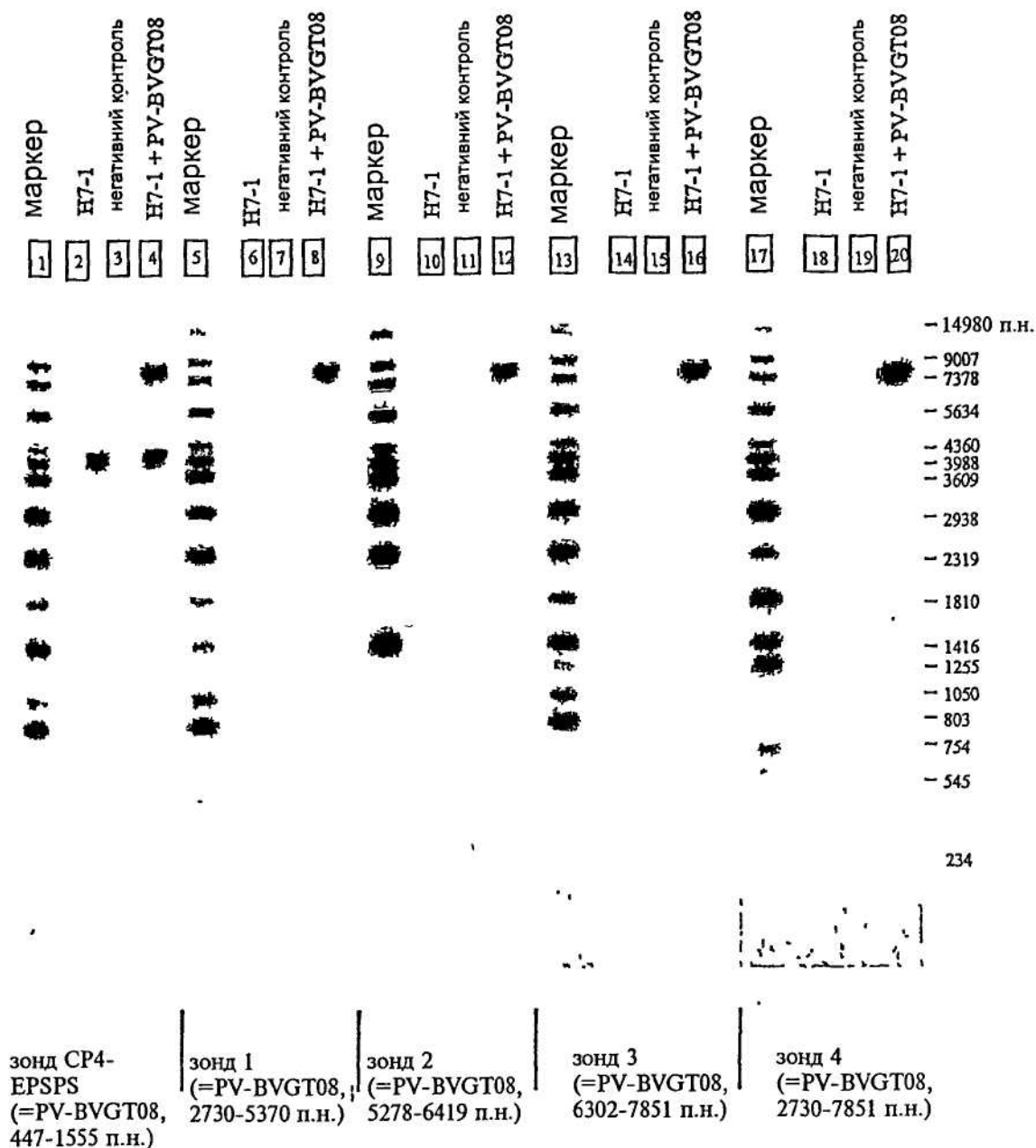
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10

GAAATAAAGA TTCCGAATT AGAATAATTT GTTTATTGCT TTGGCCTATA AATACGACGG 140
 GAAATAAAGA TTCCGAATT AGAATAATTT GTTTATTGCT TTGGCCTATA AATACGACGG 2520

 ATCGTAATTT GTCGTTTAT CAAATGTAC TTTCATTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 200
 ATCGTAATTT GTCGTTTAT CAAATGTAC TTTCATTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 2580

 ACATTTTGA ATTGAAAAA AATGGTAAT TACTCTTCT TTTCTCCAT ATTGACCATC 260
 ACATTTTGA ATTGAAAAA AATGGTAAT TACTCTTCT TTTCTCCAT ATTGACCATC 2640

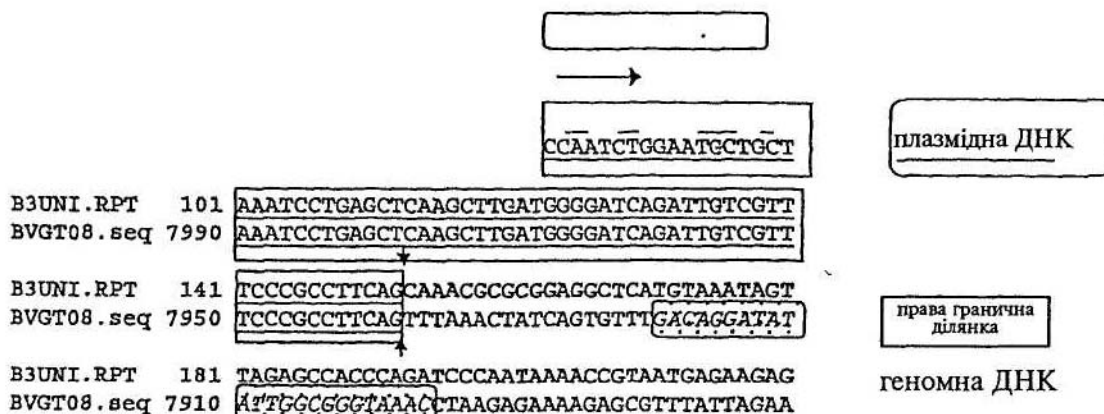
 ATACTCATTG CTGATCCATG TAGATTCCC GGACATGAAG CCAATTACAA TTGAATATAT 320
 ATACTCATTG CTGATCCATG TAGATTCCC GGACATGAAG CCAATTACAA TTGAATATAT 2700

 ↓
 CCTAAGTAAA ACCTCATAGG TTTTACGTAT TTCAATTAGG GACTAAAATG GTTTAGGATA 380
 CCTGCGCGG CTGCGCGCTT GCACCCGGTG GAGCTTGCAT GTTGGTTTCT ACGCAGAACT 2760

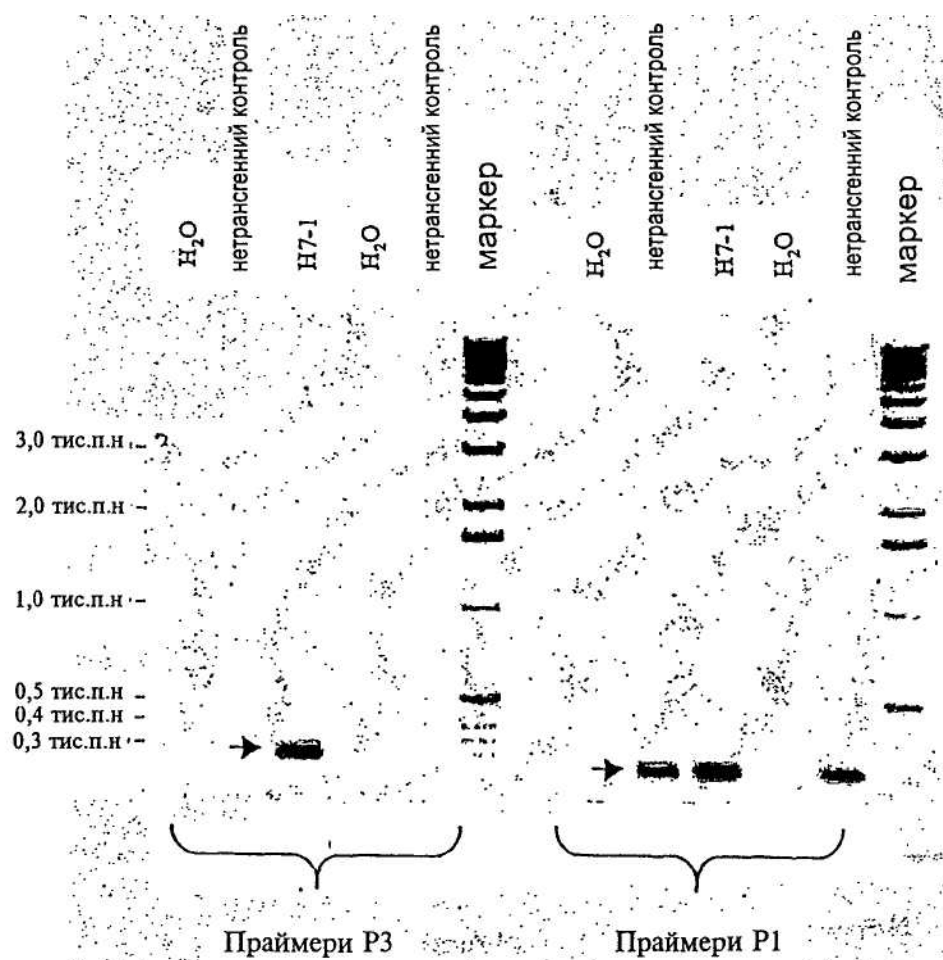
ліва
ділянка

геномна ДНК

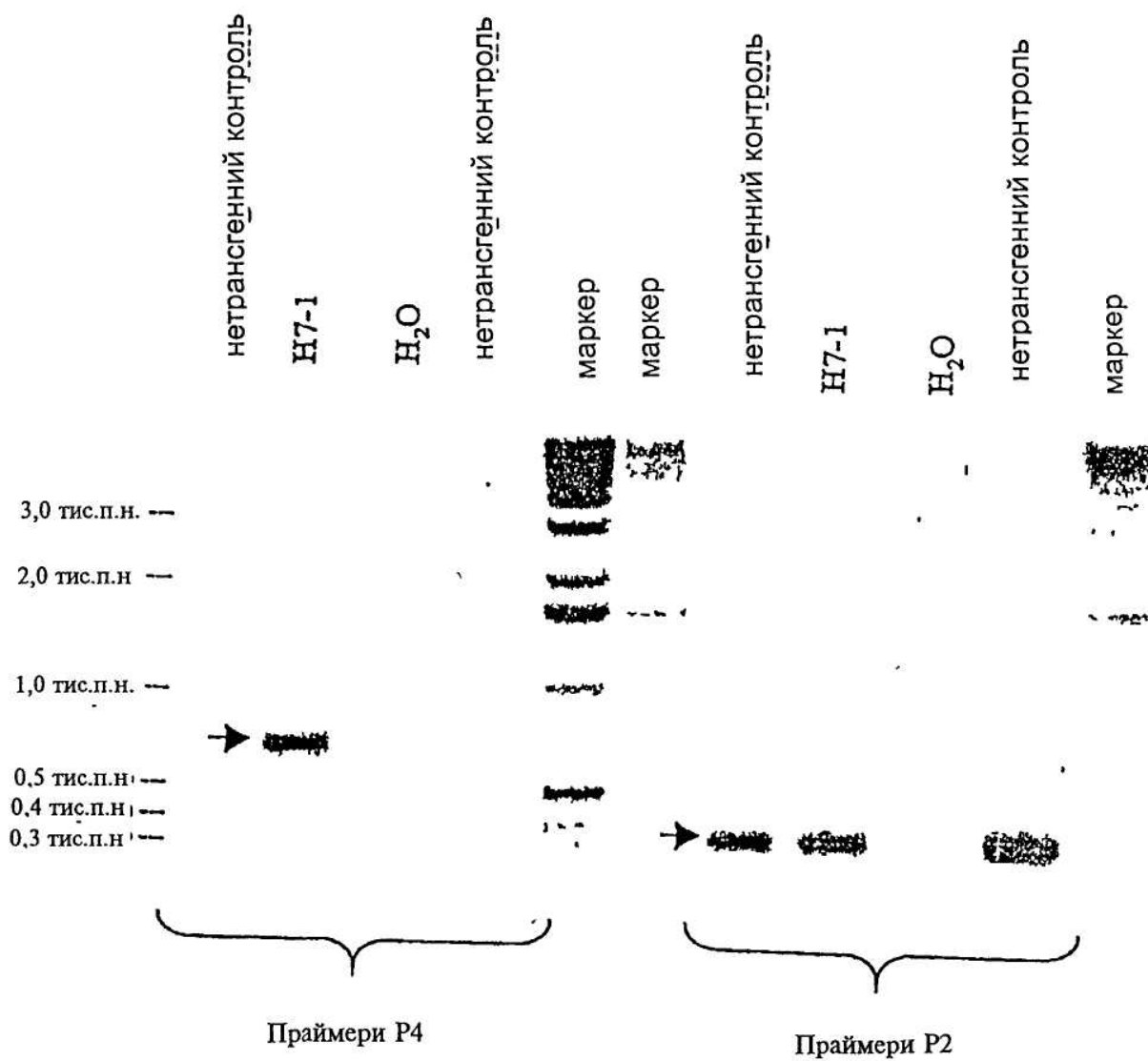
ФІГ. 11



ФІГ. 12



ФІГ. 13



ФІГ. 14

1995: вихідна подія трансформації

Розмноження самозапиленням

1996: сегрегаційний матеріал

Розмноженням самозапиленням із застосуванням лише відібраних стійких рослин

1997: сегрегаційний матеріал

Самозапилення гомозиготних рослин

1998: гомозиготна лінія

6401VH



64801H



74922H

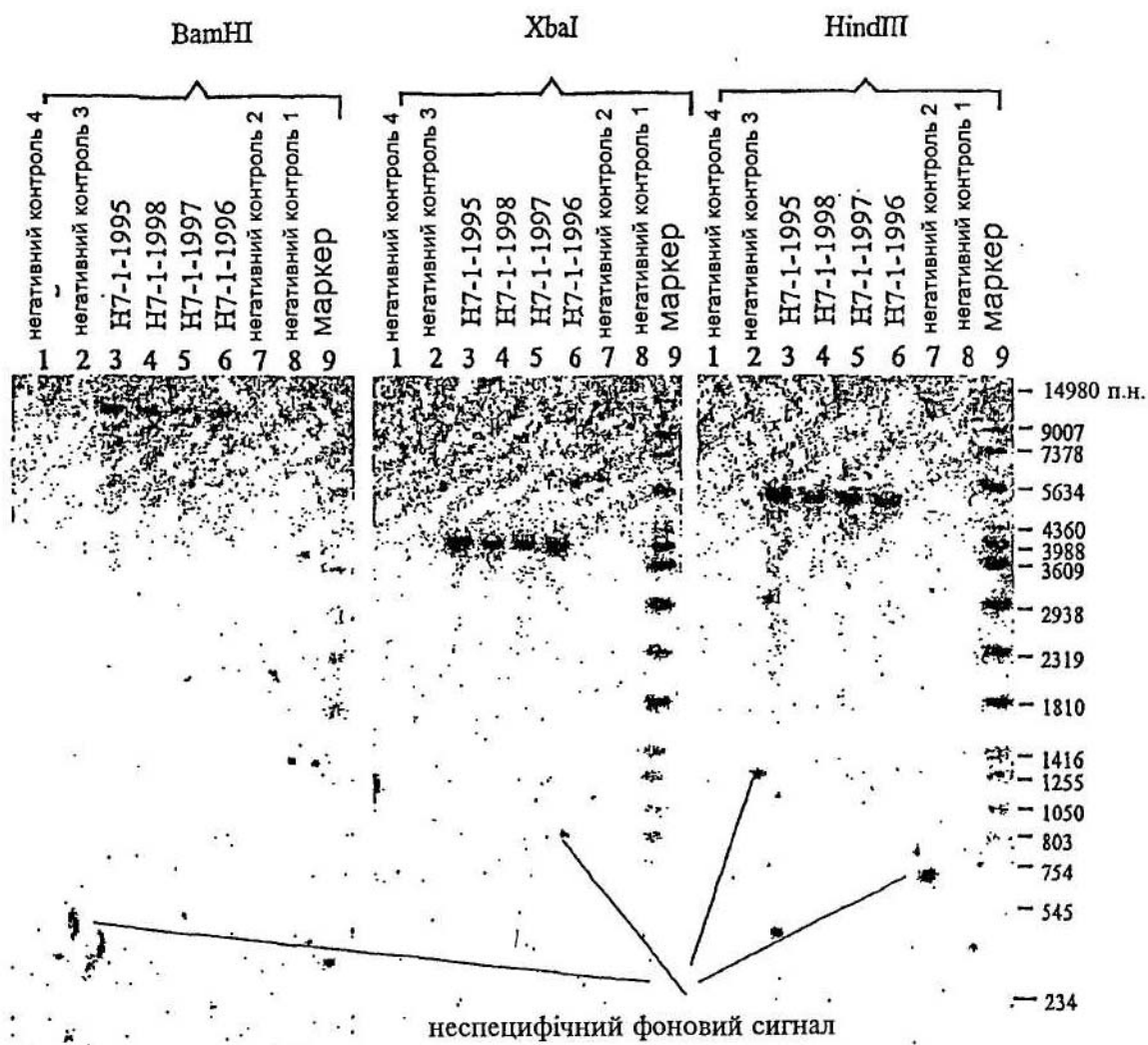


74901H



83002S

ФІГ. 15



ФІГ. 16