



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118845** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

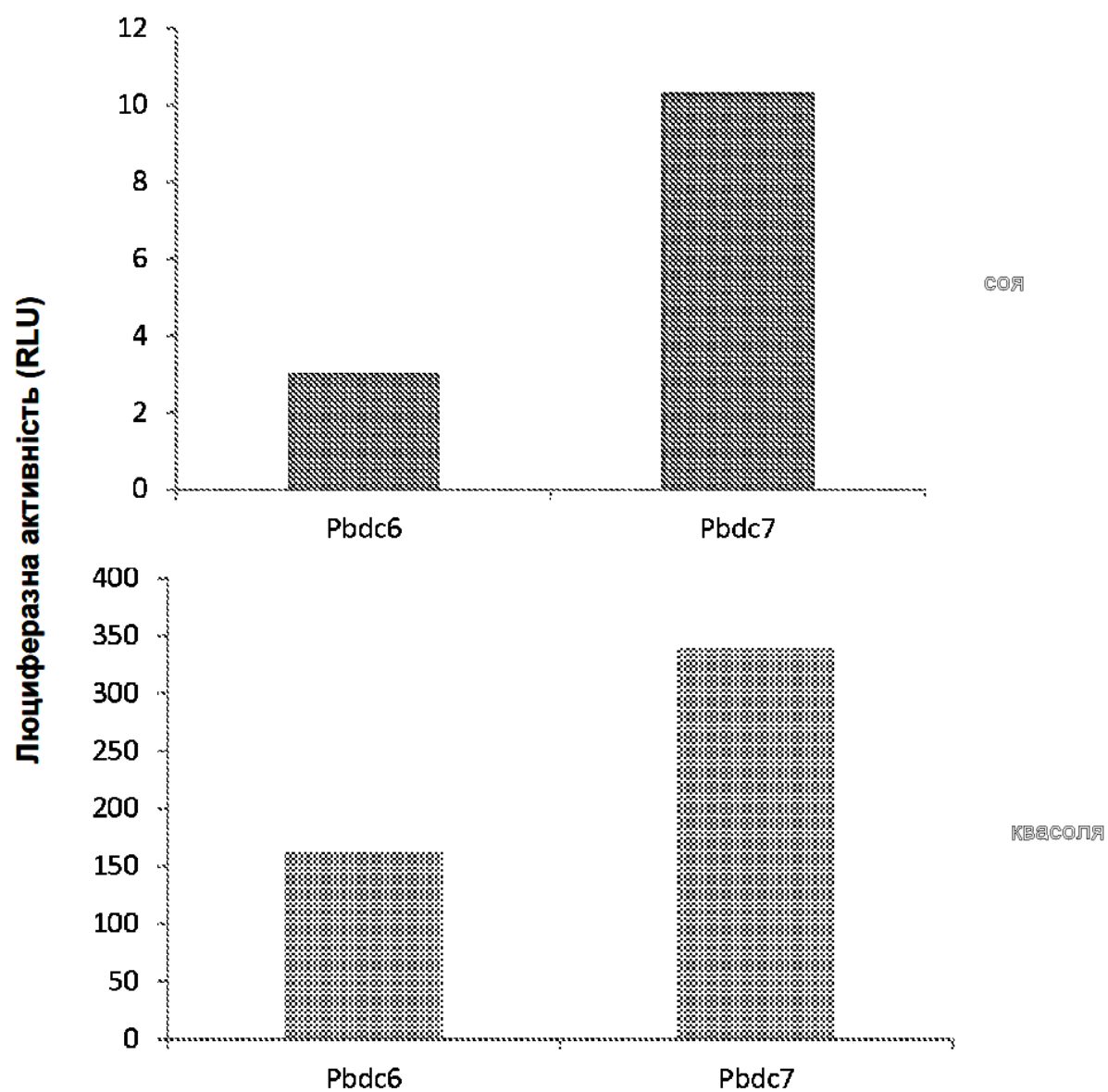
(21) Номер заявки: а 2015 10071	(72) Винахідник(и): Чжан Шіжун (US)
(22) Дата подання заявки: 11.03.2014	(73) Власник(и): БАЙЄР КРОПСАЙЄНС ЛП, 2 T.w. Alexander Drive, P.o. Box 12014, Research Triangle Park, NC 27709, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2019	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/790,907	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2009133159 A1, 21.05.2009 US 2010064390 A1, 11.03.2011 Odell J T et al, "Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35s Promoter", Nature, Nature Publishing Group, United Kingdom, 28.02.1985, vol. 313, P. 810 - 812
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.03.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.12.2015, Бюл.№ 23	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2019, Бюл.№ 6	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2014/023291, 11.03.2014	

(54) ЕКСПРЕСІЙНА КАСЕТА, ЩО МІСТИТЬ КОНСТИТУТИВНИЙ ПРОМОТОР СОЇ, ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується експресійної касети, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, функціонально зв'язану з гетерологічною нуклеїновою кислотою, де вказана послідовність ініціює транскрипцію гетерологічної нуклеїнової кислоти в рослинній клітині. Винахід також стосується вектора, який містить експресійну касету, рослинної клітини, що має у своєму геномі стабільно вбудовану експресійну касету, рослини, що має у своєму геномі стабільно вбудовану експресійну касету, трансгенного насіння та способу експресії гетерологічної нуклеїнової кислоти, що становить інтерес, в рослині.

UA 118845 C2



Фиг. 1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА РОДИННУ ЗАЯВКУ

Дана заявка заявляє перевагу попередньої заявки на патент США із серійним номером 61/790907, поданої 15 березня 2013 року, зміст якої включено в даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

5 ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, НАДАНИЙ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Копія переліку послідовностей надана в електронному вигляді за допомогою EFS-Web у вигляді переліку послідовностей у форматі ASCII з назвою файлу "2912939-20179WO 01_Sequence_Listing.txt", створеного 10 березня 2014 року, і що має розмір 4,14 кілобайт, і поданого одночасно з описом. Перелік послідовностей, що знаходиться в цьому документі у форматі ASCII, є частиною опису та включений у даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

10 ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до галузі молекулярної біології рослин, конкретніше до ідентифікації та застосування регуляторних елементів у рослин.

15 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

На сьогоднішній день існує високий попит на трансгенні рослини, що експресують біотехнологічно важливі білкові продукти на високому або індукційному рівні. Маніпуляція з культурними рослинами з метою зміни та/або покращення фенотипових характеристик (таких як продуктивність або якість) вимагає експресії гетерологічних генів у рослинних тканинах. Такі генетичні маніпуляції стали можливими завдяки двом відкриттям: можливості трансформувати гетерологічний генетичний матеріал у рослинну клітину та існуванню промоторів, що здатні керувати експресією гетерологічного генетичного матеріалу.

Серед промоторів, що використовуються найчастіше, промотор гена нопалін-синтази (NOS) (Ebert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:5745-5749 (1987)); промотор гена октопін-синтази (OCS), промотори каулімовірусів, такі як 19S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Lawton et al., Plant Mol. Biol. 9:315-324 (1987)); 35S промотор CaMV (Odell et al., Nature 313:810-812 (1985)) і 35S промотор вірусу мозаїки ранника (Sanger et al., Plant Mol. Biol. 14:433-43 (1990)); світлоіндукований промотор гена малої субодиниці RUBISCO (рибулозо-1,5-біфосфаткарбоксилаза/оксигеназа) (Pellegrineschi et al., Biochem. Soc. Trans. 23(2):247-250 (1995)); промотор гена Adh (Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:6624-66280 (1987)); промотор гена сахарозосинтази. (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4144-4148 (1990)); промотор комплексу R-генів (Chandler et al., Plant Cell 1:1175-1183 (1989)); промотор гена хлорофіл a/b-зв'язуючого білка й таке інше.

Ідентифікація та виділення регуляторних елементів, придатних для сильної або індукційної експресії генів мікроорганізмів та рослин, будуть корисні для розробки комерційних сортів трансгенних рослин.

35 СТИСЛИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Передбачаються композиції та способи для регулювання експресії генів у рослині. Композиції містять нуклеотидні послідовності з Glycine max та їх варіанти, які ініціюють транскрипцію в рослині. Зокрема, передбачається ділянка ініціації транскрипції, виділена із гена гама-білка тонопласта та білка плазматичної мембрани Glycine max. Додаткові композиції за даним винаходом містять нуклеотидні послідовності, викладені в SEQ ID NO:1 і 2, а також їх варіанти та фрагменти. Композиції даного винаходу також включають експресійні касети, що містять промотор за даним винаходом, функціонально пов'язаний з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес. Даний винахід додатково передбачає вектори, що містять експресійні касети, а також рослини та рослинні клітини, що містять стабільно вбудовану в їх геном експресійну касету, описану вище. Крім того, композиції включають трансгенне насіння таких рослин.

З промотором функціонально пов'язана послідовність, що становить інтерес та може модифікувати фенотип рослини. Така модифікація може включати, наприклад, модуляцію продукування ендогенного продукту, або вона може включати продукування екзогенного продукту експресії для забезпечення нової функції або продукту в рослині. Наприклад, даним описом охоплюється гетерологічна нуклеотидна послідовність, що кодує генний продукт, який надає стійкість до гербіцидів або шкідників.

55 ОПИС ФІГУР

На фігурі 1 показано високий рівень експресії люциферази у випадку, коли її ген перебуває під контролем промоторів Pbdc6 (SEQ ID NO:1) і Pbdc7 (SEQ ID NO:2).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до композицій і способів для регуляції експресії генів у рослинах або рослинних клітинах. Композиції за даним винаходом містять нові нуклеотидні послідовності

для промоторів сої. Зокрема, даний винахід передбачає виділені молекули нуклеїнових кислот промотора, що містять нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO:1 або 2, а також її фрагменти та варіанти. Крім того, передбачаються трансформовані рослини, рослинні клітини та насіння.

5 Промоторні послідовності за даним винаходом, коли вони зібрані в ДНК-конструкції таким чином, що промотор функціонально пов'язаний із нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес, регулюють експресію нуклеотидної послідовності в клітинах організму, стабільно трансформованого цією ДНК-конструкцією, зокрема, у рослинних клітинах. Промоторні послідовності також можуть бути придатними в якості зондів для виділення інших промоторних послідовностей або генів сої, в якості молекулярних маркерів і т.п.

10 Способи експресії нуклеотидної послідовності в рослині передбачають введення в клітини рослин експресійної касети, що містить промотор за даним винаходом, функціонально пов'язаний із нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес, і регенерацію трансформованої рослини із рослинної клітини.

15 Використовувані в даному документі форми однини позначають один або більше одного (тобто щонайменше один) граматичного об'єкта, наведеного в такій формі. Наприклад, "елемент" означає один або кілька елементів.

Мається на увазі, що використовуваний у даному документі термін "молекула нуклеїнової кислоти" включає молекули ДНК (наприклад, кДНК або геномної ДНК) і молекули РНК (наприклад, мРНК), а також аналоги ДНК або РНК, отримані із використанням нуклеотидних аналогів. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно є дволанцюговою ДНК.

20 "Виділена" або "очищена" молекула нуклеїнової кислоти або її біологічно активна частина практично не містить іншого клітинного матеріалу або культурального середовища, якщо вона отримана за допомогою рекомбінантних технологій, або практично не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин, якщо вона синтезована хімічним шляхом. Переважно, "виділена" нуклеїнова кислота не містить послідовностей (переважно послідовностей, що кодують білок), які зазвичай фланкують молекулу нуклеїнової кислоти (тобто послідовності, розташовані на 5'- і 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) у геномній ДНК організму, з якого отримана нуклеїнова кислота. У контексті даного винаходу "виділений" при використанні стосовно молекул нуклеїнової кислоти виключає виділені хромосоми. Наприклад, у різних варіантах здійснення даного винаходу молекула промотора може містити менше ніж приблизно 5 т.н., 4 т.н., 3 т.н., 2 т.н., 1 т.н., 0,5 т.н. або 0,1 т.н. нуклеотидної послідовності, що зазвичай фланкує молекулу нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої отримана нуклеїнова кислота. Різні аспекти даного винаходу описані детальніше в наступних підрозділах.

35 Виділені молекули нуклеїнової кислоти та їх варіанти та фрагменти

Нуклеотидні послідовності за даним винаходом включають промоторні послідовності, викладені в SEQ ID NO:1 і 2, та їх варіанти. Під "промотором" мають на увазі послідовність нуклеїнової кислоти, яка функціонує з метою керування транскрипцією кодуючої послідовності, що лежить нижче. Промотор, як правило, містить послідовність ДНК, гомологічну консенсусній послідовності 5'-ТАТААТ-3' (ТАТА-боксу), розташованій приблизно за 10-30 пар основ у 5' напрямку від сайту початку транскрипції ("кеп"), яка здатна направляти РНК-полімеразу для ініціації синтезу РНК. Промотори можуть додатково включати інші послідовності розпізнавання, як правило, розташовані вище або в напрямку 5' кінця відносно ТАТА-боксу, що називаються промоторними елементами, що лежать вище, які впливають на швидкість ініціації транскрипції. Вони включають СААТ-бокс, який часто знаходиться на відстані приблизно 30-70 пар основ у напрямку до 5' кінця відносно ТАТА-боксу та характеризуються гомологією з канонічною формою 5'-ССААТ-3' (Breathnach and Chambon (1981) Ann. Rev. Biochem. 50:349-383). У рослинах СААТ-бокс іноді замінений послідовністю, відомою як АГГА-бокс, ділянкою, в якій залишки аденіну симетрично фланкують триплет G(абоT)NG (Messing et al. (1983), в Genetic Engineering of Plants, T. Kosuge, C. Meredith and A. Hollaender (eds.), Plenum Press, New York, pp. 211-227). Ці елементи разом з іншими транскрипційними та трансляційними регуляторними послідовностями нуклеїнової кислоти (що також називають "керуючими послідовностями") необхідні для експресії послідовності ДНК, що становить інтерес. Не описані в даному документі способи виділення та ідентифікації регуляторних елементів, таких як енхансери та елементи, відповідальні за експресію кодуючої ділянки у певних тканинах або в певний час, добре відомі у рівні техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5635618, 6218140, 6303370, 6310197 і 6355864.

60 Під "коровим промотором" мається на увазі промотор без промоторних елементів. Коровий промотор містить необхідні для функціонування промотора нуклеотидні послідовності, у тому

числі ТАТА-бокс і сайт ініціації транскрипції. Така ділянка звичайно присутня, з певними змінами, в більшості промоторів. Ділянка корового промотора часто називається мінімальною промоторною ділянкою, оскільки вона сама по собі є функціональною для забезпечення базального рівня транскрипції. У різних варіантах здійснення даного винаходу послідовність корового промотора для Pbdc6 приблизно відповідає нуклеотидам з 29 по 318 в SEQ ID NO:1; ТАТА приблизно відповідає нуклеотидам з 288 по 296 в SEQ ID NO:1; і сайт ініціації трансляції відповідає положенню нуклеотида 318 в SEQ ID NO:1. В інших варіантах здійснення даного винаходу послідовність корового промотора для Pbdc7 приблизно відповідає нуклеотидам з 1341 по 1643 в SEQ ID NO:2; ТАТА приблизно відповідає нуклеотидам з 1603 по 1608 в SEQ ID NO:2; і сайт ініціації трансляції відповідає положенню нуклеотида 1643 в SEQ ID NO:2. Фахівцві у даній галузі техніки буде зрозуміло, що ділянка корового промотора може відрізнятися від наведених вище положень на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше нуклеотидів у напрямку вище або нижче, і такі зміни в межах послідовності корового промотора можуть допускатися.

Молекули нуклеїнової кислоти, які являють собою фрагменти розкритих промоторних послідовностей, також охоплюються даним винаходом. Під "фрагментом" мається на увазі частина промоторної послідовності. Фрагмент нуклеотидної послідовності може бути біологічно активним і, отже, здатним ініціювати транскрипцію функціонально пов'язаної нуклеотидної послідовності в рослині, або він може являти собою фрагмент, який можна застосовувати в якості гібридизаційного зонда або ПЛР праймера із застосуванням способів, описаних нижче. Аналізи для визначення здатності таких фрагментів знижувати рівні експресії або змінювати характер експресії, тобто конститутивну або індуквану експресію, добре відомі у рівні техніки.

Молекули нуклеїнових кислот, що є фрагментами промоторної послідовності, можуть містити щонайменше приблизно 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 суміжних нуклеотидів або нуклеотиди в кількості аж до числа нуклеотидів, присутніх у повнорозмірній промоторній послідовності, розкритій в даному документі (наприклад, 1230 нуклеотидів для SEQ ID NO:1 або 1688 нуклеотидів для SEQ ID NO:2), залежно від передбачуваного застосування. Під "суміжними" нуклеотидами маються на увазі залишки нуклеїнової кислоти, які безпосередньо приєднуються один до одного. Біологічно активні фрагменти промоторів за даним винаходом будуть зберігати промоторну активність (тобто ініціювати транскрипцію). Під "збереженням промоторної активності" мається на увазі, що фрагмент буде мати щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 70 % або щонайменше приблизно 80 % від промоторної активності повнорозмірного промотора. Біологічно активну частину промотора можна одержати шляхом виділення частини однієї із промоторних нуклеотидних послідовностей за даним винаходом й оцінюючи активність цієї частини промотора. Способи вимірювання активності промотора добре відомі у рівні техніки. Див. розділ під назвою "Оцінка активності промотора" для прикладів придатних способів.

Такі фрагменти, як правило, будуть містити послідовність розпізнавання ТАТА-боксу в конкретній промоторній послідовності. Ці фрагменти можна одержати шляхом розщеплення промоторної послідовності, що зустрічається в природних умовах та описана в даному документі, ферментами рестрикції, шляхом синтезу наявної в природних умовах нуклеотидної послідовності ДНК промотора або із застосуванням технології ПЛР. Див., зокрема, Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350, і Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, New York). Варіанти цих фрагментів промотора, як таких, що були отримані в результаті сайт-спрямованого мутагенезу, також охоплюються композиціями за даним винаходом.

Також охоплюються варіанти промоторних послідовностей, розкритих у даному документі. Під "варіантом" мається на увазі достатньо ідентична послідовність. Промоторні послідовності, охоплені даним винаходом, є достатньо ідентичними нуклеотидній послідовності SEQ ID NO:1 або 2. Під "достатньо ідентичною" мається на увазі нуклеотидна послідовність, яка щонайменше приблизно на 70 % або 75 %, приблизно на 80 % або 85 % ідентична, приблизно на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична еталонній послідовності при використанні однієї із програм вирівнювання, як описано в даному документі.

Варіанти, що зустрічаються в природних умовах, можуть бути ідентифіковані із застосуванням добре відомих молекулярно-біологічних методів, таких як полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) і методи гібридизації, як зазначено нижче. Варіантні нуклеотидні послідовності також включають послідовності синтетичного походження, створені, наприклад, із використанням сайт-спрямованого мутагенезу, але які все ще мають промоторну активність, як визначено в даному документі.

Охоплювані даним винаходом варіанти є біологічно активними, тобто вони як і раніше мають необхідну біологічну активність нативної послідовності, тобто зберігають промоторну

активність (тобто ініціюють транскрипцію). Під "збереженням промоторної активності" мається на увазі, що варіант буде характеризуватися активністю, що становить щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 50 %, або щонайменше приблизно 70 %, або щонайменше приблизно 80 % або більше від промоторної активності нативної послідовності. Способи вимірювання промоторної активності добре відомі у рівні техніки. Див. розділ під назвою "Оцінка промоторної активності" для прикладів придатних способів.

Фахівцеві в даній галузі техніки також буде зрозуміло, що зміни можуть бути внесені шляхом мутації в нуклеотидні послідовності за даним винаходом без зміни здатності промотора керувати експресією в рослинній клітині. Таким чином, варіантні виділені молекули нуклеїнової кислоти можна створити шляхом введення однієї або декількох нуклеотидних замінів, додавань або делецій у відповідну нуклеотидну послідовність, розкриту в даному документі. Мутації можуть бути введені за допомогою стандартних методик, таких як сайт-спрямований мутагенез і ПЛР-опосередкований мутагенез. Такі варіантні нуклеотидні послідовності також охоплюються даним винаходом.

В якості альтернативи, варіантні нуклеотидні послідовності можна одержати шляхом введення мутацій випадковим чином уздовж усієї промоторної послідовності або її частини, наприклад, шляхом мутагенезу, що насичує, і отримані мутантні послідовності можна піддати скринінгу на здатність керувати експресією функціонально пов'язаної нуклеотидної послідовності в рослинній клітині.

Під "функціонально пов'язаним" мається на увазі функціональний зв'язок між промотором і другою послідовністю, де промоторна послідовність ініціює та опосередковує транскрипцію послідовності ДНК, що відповідає другій послідовності. Як правило, але не завжди, функціонально пов'язаний означає, що послідовності нуклеїнової кислоти є суміжними, а якщо необхідно з'єднати дві ділянки, що кодують білок, вони є суміжними та знаходяться в одній і тій самій рамці читування.

Для визначення процентної ідентичності двох нуклеїнових кислот, послідовності вирівнюють з метою отримання оптимального порівняння. Процентна ідентичність між двома послідовностями залежить від числа ідентичних положень, загальних для послідовностей (тобто процентна ідентичність = $\frac{\text{число ідентичних положень}}{\text{загальне число положень}} \times 100$). В одному варіанті здійснення даного винаходу дві послідовності мають однакову довжину. Процентну ідентичність двох послідовностей можна визначити із застосуванням методик, аналогічних описаним нижче, із або без забезпечення можливості гепів. При розрахунках відсоткової ідентичності підраховують, як правило, точні збіги.

Визначення процентної ідентичності двох послідовностей можна здійснювати із використанням математичного алгоритму. Необмежуючим прикладом математичного алгоритму, застосованого для порівняння двох послідовностей, є алгоритм за Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифікований як в Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такий алгоритм включений у програму BLASTN за Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Пошук нуклеотидів BLAST може бути виконаний за допомогою програми BLASTN, оцінка = 100, довжина слова = 12, для отримання нуклеотидних послідовностей, гомологічних промоторам за даним винаходом. Щоб отримати вирівнювання з гепами з метою порівняння, можна застосовувати Gapped BLAST, як описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. В якості альтернативи можна використати PSI-BLAST для виконання ітеративного пошуку, який виявляє віддалене споріднення між молекулами. Див. Altschul et al. (1997), вище. При використанні програм BLAST, Gapped BLAST і PSI-BLAST можуть бути застосовані параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTN). Див. www.ncbi.nlm.nih.gov. Іншим необмежуючим прикладом математичного алгоритму, що можна застосовувати для порівняння послідовностей, є алгоритм ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW порівнює послідовності та здійснює вирівнювання вздовж усієї послідовності ДНК, і, отже, може представити дані про консервативність послідовності всієї нуклеотидної послідовності. Алгоритм ClustalW використовується в декількох комерційно доступних пакетах програмного забезпечення для аналізу ДНК, таких як модуль ALIGNX у наборі програмного забезпечення vector NTi Program Suite (Informax, Inc). Необмежуючим прикладом програмного забезпечення, придатного для аналізу вирівнювань із використанням алгоритму ClustalW, є Genedoc™. Genedoc™ (Karl Nicholas), що дозволяє оцінити подібність та ідентичність ДНК між декількома генами. Іншим переважним, але необмежуючим прикладом математичного алгоритму, що можна використовувати для порівняння послідовностей, є алгоритм за Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такий алгоритм включений у програму ALIGN (версія 2.0), що є частиною пакету

програмного забезпечення для вирівнювання послідовностей GCG (доступного від Accelrys, Inc., 9865 Scranton Rd., Сан-Дієго, Каліфорнія, США).

Якщо не зазначено інше, GAP версія 10, в якій використовується алгоритм за Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, буде застосована для визначення ідентичності або подібності послідовності із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із використанням штрафу за відкриття гепу 50 і штрафу за продовження гепу 3 та оцінної матриці `nwsgapdna.cmp`; % ідентичності або % подібності для амінокислотної послідовності з використанням штрафу за відкриття гепу 8 і штрафу за продовження гепу 2 та оцінної програми BLOSUM62. Також можуть бути використані еквівалентні програми. Під "еквівалентною програмою" мається на увазі будь-яка програма для порівняння послідовностей, яка для будь-яких двох послідовностей у запиті створює вирівнювання, що має ідентичні збіги нуклеотидних залишків та ідентичну процентну ідентичність послідовності у порівнянні з відповідним вирівнюванням, створеним GAP версії 10.

За допомогою таких способів, як ПЛР, гібридизація і т.п., можна ідентифікувати відповідні послідовності з інших організмів, зокрема, інших рослин, такі послідовності характеризуються суттєвою ідентичністю з послідовностями за даним винаходом. Див., наприклад, Sambrook J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY); i Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY). Послідовності, ідентифіковані за їх ідентичністю із промоторними послідовностями, викладеними в даному документі, охоплюються даним винаходом.

Олігонуклеотидні праймери можна сконструювати для застосування в реакціях ПЛР для ампліфікації відповідних послідовностей ДНК із кДНК або геномної ДНК із рослини, що становить інтерес. Способи конструювання ПЛР праймерів і ПЛР-клонування, як правило, відомі у рівні техніки та описані в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Див., також, Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); i Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Відомі способи ПЛР включають без обмеження способи із застосуванням спарених праймерів, вкладених праймерів, одиночних специфічних праймерів, вироджених праймерів, ген-специфічних праймерів, вектор-специфічних праймерів і частково невідповідних праймерів.

У способі гібридизації для скринінгу кДНК або геномних бібліотек можна використовувати повну відому нуклеотидну послідовність або її частину. Способи створення таких кДНК і геномних бібліотек, як правило, відомі у рівні техніки та описані в Sambrook and Russell, 2001, вище. Зонди для гібридизації можуть бути фрагментами геномної ДНК, фрагментами кДНК, фрагментами РНК або іншими олігонуклеотидами та можуть бути позначені групою із можливістю її детектування, такою як ^{32}P , або будь-яким іншим маркером із можливістю детектування, таким як інші радіоізотопи, флуоресцентна сполука, фермент або кофактор ферменту. Зонди для гібридизації можна одержати шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів, виходячи з відомої послідовності промотора, описаної в даному документі. Також можна застосовувати вироджені праймери, створені на основі консервативних нуклеотидів у нуклеотидній послідовності. Зонд, як правило, містить ділянку нуклеотидної послідовності, що гібридується в жорстких умовах щонайменше приблизно з 12, щонайменше приблизно з 25, щонайменше приблизно з 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 або 400 послідовними нуклеотидами в промоторній послідовності за даним винаходом або її фрагменті або варіанті. Одержання зондів для гібридизації, як правило, відомо у рівні техніки і описано в Sambrook and Russell, 2001, вище, включений в даний документ за допомогою посилання.

Наприклад, повну промоторну послідовність, описану в даному документі, або одну або декілька її частин, можна застосовувати в якості зонда, здатного до специфічної гібридизації з відповідною промотор-подібною послідовністю. Для досягнення специфічної гібридизації за різних умов такі зонди мають у своєму складі послідовності, які є унікальними та мають довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можуть бути використані для ампліфікації відповідних промоторних послідовностей із необхідного організму за допомогою ПЛР. Ця технологія може бути використана для виділення додаткових кодуючих послідовностей із необхідного організму або в якості діагностичного аналізу для визначення наявності кодуючих послідовностей в організмі. Методики гібридизації включають гібридизаційний скринінг висіяних ДНК бібліотек (або бляшок, або колоній; див, наприклад, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)).

Гібридизацію таких послідовностей можна проводити в жорстких умовах. Під "жорсткими умовами" або " жорсткими умовами гібридизації" маються на увазі умови, за яких зонд гібридується зі своєю цільовою послідовністю в більшому ступені (що можна детектувати), ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше в 2 рази більше у порівнянні із фоном).

Жорсткі умови залежать від послідовності та будуть відрізнятися за різних обставин. Контролюючи жорсткість умов гібридизації й/або умови відмивки, можна ідентифікувати цільові послідовності, які комплементарні зонду на 100 % (гомологічне зондування). В якості альтернативи, жорсткість умов можна регулювати для забезпечення можливості деякої розбіжності в послідовностях для того, щоб виявити нижчі ступені подібності (гетерологічне зондування). Як правило, зонд має довжину менше приблизно 1000 нуклеотидів або менше 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткими умовами будуть вважатися умови, за яких концентрація солі становить менше приблизно 1,5 М іонів Na, звичайно за концентрації іонів Na (або інших солей) приблизно 0,01-1,0 М за pH 7,0-8,3, і температура становить щонайменше приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більше 50 нуклеотидів). Жорстких умов можна також досягнути додаванням дестабілізуючих засобів, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості включають гібридизацію в буферному розчині 30-35 % формаміду, 1 М NaCl, 1 % SDS (додецилсульфат натрію) при 37 °C і відмивку в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М цитрат натрію тризаміщений) при 50-55 °C. Ілюстративні умови помірної жорсткості включають гібридизацію у 40-45 % формаміді, 1,0 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C і відмивку в 0,5-1X SSC при 55-60 °C. Ілюстративні умови високої жорсткості включають гібридизацію в 50 % формаміді, 1 М NaCl, 1 % SDS при 37 °C і відмивку в 0,1X SSC при 60-65 °C. Необов'язково, буфери для відмивки можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS. Тривалість гібридизації, як правило, становить менше приблизно 24 годин, зазвичай від приблизно 4 до приблизно 12 годин. Необов'язково, буфери для відмивки можуть містити від приблизно 0,1 % до приблизно 1 % SDS.

Специфічність, як правило, залежить від відмивок після гібридизації, причому вирішальними факторами є іонна сила та температура кінцевого розчину для відмивки. Для гібридів ДНК-ДНК T_m можна апроксимувати з рівняння за Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ формаміду}) - 500/L$; де M являє собою молярність одновалентних катіонів, %GC являє собою процентний вміст гуанозинових та цитозинових нуклеотидів у ДНК, % формаміду являє собою процентний вміст формаміду в розчині для гібридизації; і L являє собою довжину гібрида в парах основ. T_m являє собою температуру (за певних іонної сили та pH), за якої 50 % комплементарної цільової послідовності гібридизуються з ідеально співпадаючим зондом. T_m знижується приблизно на 1 °C для кожного 1 % розбіжності; отже, T_m , умови гібридизації та/або відмивки можна регулювати для гібридизації з послідовностями необхідної ідентичності. Наприклад, якщо проводять пошук послідовностей з ідентичністю >90 %, T_m можна зменшити на 10 °C. Як правило, жорсткі умови обирають таким чином, щоб температура за них була приблизно на 5 °C нижче температури плавлення (T_m) для конкретної послідовності та її комплементарної послідовності за певних іонної сили та pH. Проте, за дуже жорстких умов гібридизацію та/або відмивку можна проводити при температурі, яка на 1, 2, 3 або 4 °C нижче температури плавлення (T_m); за помірно жорстких умов гібридизацію та/або відмивку можна проводити при температурі, яка на 6, 7, 8, 9 або 10 °C нижче температури плавлення (T_m); за умов низької жорсткості гібридизацію та/або відмивку можна проводити при температурі, яка на 11, 12, 13, 14, 15 або 20 °C нижче температури плавлення (T_m). Із використанням рівняння, композицій для гібридизації та відмивки та необхідної T_m , фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що зміни жорсткості умов гібридизації та/або розчинів для відмивки, по суті, вже описані. Якщо необхідний рівень розбіжностей призводить до T_m менше 45 °C (водний розчин) або 32 °C (розчин з формамідом), концентрацію SSC можна підвищити для того, щоб можна було використовувати вищу температуру. Вичерпний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведений в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); і Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див., Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Виділені послідовності, які характеризуються промоторною активністю та гібридизуються в жорстких умовах із промоторними послідовностями, розкритими в даному документі, або їх фрагментами, охоплюються даним винаходом.

Способи застосування

Способи за даним винаходом спрямовані на експресію гетерологічних нуклеотидних послідовностей у рослинах і рослинних клітинах під контролем промоторної послідовності за даним винаходом. Трансгенні рослини можуть мати зміну у фенотипі, у тому числі без обмеження змінений механізм захисту від патогенів або комах, підвищену стійкість до одного або декількох гербіцидів, підвищену здатність витримувати стресові умови навколишнього середовища, модифіковану здатність виробляти крохмаль, модифікований рівень вироблення крохмалю, модифікований вміст олії та/або її склад, модифіковану здатність використовувати, розподіляти та/або запасати азот і т.п. Ці результати можуть бути досягнуті шляхом експресії гетерологічних генів або підвищеної експресії ендегенних продуктів у рослинах. В якості альтернативи, результати можуть бути досягнуті за рахунок зниження експресії одного або декількох ендегенних продуктів, особливо ферментів, транспортерів або кофакторів, або шляхом впливу на поглинання поживних речовин у рослині.

Як правило, нуклеотидна послідовність промотора за даним винаходом забезпечується в експресійній касеті із нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес, зазвичай гетерологічною нуклеотидною послідовністю, для експресії в рослині, що становить інтерес. Під "гетерологічною нуклеотидною послідовністю" мається на увазі послідовність, яка в природних умовах не є функціонально пов'язаною із промоторною послідовністю, включаючи множинні копії, що не зустрічаються в природних умовах, послідовності ДНК, що зустрічається в природних умовах. Хоча ця нуклеотидна послідовність є гетерологічною щодо промоторної послідовності, вона може бути гомологічною, або нативною, чи гетерологічною, або чужорідною, щодо рослини-хазяїна. Зрозуміло, що промотор може також керувати експресією гомологічної або нативної нуклеотидної послідовності. У деяких випадках трансформована рослина може мати зміну у фенотипі. Гетерологічні послідовності нуклеїнової кислоти включають такі, що є екзогенними або відсутніми в нетрансформованій рослинній клітині, а також такі, що можуть бути ендегенними або присутніми в нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний", як правило, відноситься до послідовностей нуклеїнової кислоти, що не є ендегенними щодо клітини або частини нативного геному, у якому вони знаходяться, а були додані в клітину шляхом інфекції, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, шляхом бомбардування мікрочастинками або т.п.

Будь-яку послідовність, що становить інтерес, можна експресувати за допомогою промоторних послідовностей за даним винаходом. Такі гетерологічні нуклеотидні послідовності включають кодуючі послідовності, що забезпечують стійкість до гербіцидів, кодуючі послідовності, що забезпечують інсектицидний ефект, кодуючі послідовності, що забезпечують нематодцидний ефект, кодуючі послідовності, що забезпечують антимікробний ефект, кодуючі послідовності, що забезпечують протигрибковий ефект, кодуючі послідовності, що забезпечують протівірусний ефект, кодуючі послідовності, що забезпечують витривалість до біотичних та абіотичних стресів, або послідовності, що модифікують ознаки рослин, такі як урожайність, якість зерна, вміст поживних речовин, якість і кількість крохмалю, фіксація та/або утилізація азоту та вміст та/або склад олії, але не обмежуються ними.

Більш конкретні гени, що становлять інтерес, за даним винаходом включають без обмеження гени, які покращують урожайність, гени, які покращують привабливість культур, гени, що кодують білки, які надають стійкість до абіотичного стресу, такого як посуха, температура, засолення, токсичні метали або мікроелементи, або гени, які надають стійкість до токсинів, таких як пестициди та гербіциди, або до біотичного стресу, такого як зараження грибами, вірусами, бактеріями, комахами та нематодами, а також розвиток хвороб, пов'язаних із цими організмами. Зрозуміло, що будь-який ген, що становить інтерес, може бути функціонально пов'язаним із промоторними послідовностями за даним винаходом і може експресуватися в рослині.

Ці гетерологічні нуклеотидні послідовності можуть кодувати білки, залучені до забезпечення стійкості до хвороб або шкідників. Під "стійкістю до хвороб" або "стійкістю до шкідників" мається на увазі, що рослини уникають шкідливих симптомів, які є наслідком взаємодій рослина-патоген. Всі з генів білків, що забезпечують стійкість до хвороб і шкідників, таких як лізоцими або цекропіни, для антибактеріального захисту, або білків, таких як дефензини, глюканазі або хітинази, для протигрибкового захисту, або ендотоксинів *Bacillus thuringiensis*, інгібіторів протеаз, колагеназ, лектинів або глікозидаз для боротьби з нематодами або комахами, являють собою приклади придатних генних продуктів. Приклади генів, що становлять інтерес, можна знайти, наприклад, на сайті www.nbiar.vt.edu/cfdocs/fieldtests2.cfm.

"Шкідник" включає комах, гриби, бактерії, віруси, нематод, кліщів, свербунів і т.п., але не обмежується ними. Комахи-шкідники включають комах, обраних із рядів Coleoptera, Diptera,

Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera і т.д., особливо, Coleoptera, Lepidoptera і Diptera. Віруси включають вірус мозаїки тютюну або огірка, вірус кільцевої плямистості, вірус некрозу, вірус карликової мозаїки маїсу і т.д., але не обмежуються ними. Нематоди включають без обмеження паразитичних нематод, таких як яванська галова нематода, цистоутворююча нематода, нематоди, що ранять, у тому числі нематод *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. і *Globodera* spp.; особливо, представників цистоутворюючих нематод, у тому числі без обмеження *Heterodera glycines* (соєву цистоутворюючу нематоду); *Heterodera schachtii* (бурякову нематоду); *Heterodera avenae* (злакову цистоутворюючу нематоду) і *Globodera rostochiensis* і *Globodera pallida* (картопляну нематоду). Нематоди, що ранять, включають без обмеження *Pratylenchus* spp. Грибкові шкідники включають таких, що викликають листову, жовту та стеблову іржі.

Термін "білок, що забезпечує стійкість до гербіцидів", або білок, отриманий у результаті експресії "молекули нуклеїнової кислоти, що кодує стійкість до гербіцидів", включає білки, які надають клітині здатність витримувати вищу концентрацію гербіциду, ніж клітини, що не експресують білок, або витримувати певну концентрацію гербіциду протягом більш тривалого періоду часу, ніж клітини, які не експресують білок. Ознаки стійкості до гербіцидів можуть бути надані рослини за допомогою генів, що кодують стійкість до гербіцидів, які діють шляхом інгібування активності ацетолактат-синтази (ALS), особливо, гербіцидів сульфонілсечовинного типу, генів, що кодують стійкість до гербіцидів, які діють шляхом інгібування активності глутамін-синтази, таким як фосфінотрицин або Басти (наприклад, ген *bar*), гліфосат (наприклад, ген EPSP-синтази та ген *GAT*), або інших подібних генів, відомих у рівні техніки.

Гени, які покращують урожайність культури, включають гени карликовості, такі як *Rht1* і *Rht2* (Peng et al. (1999) *Nature* 400:256-261), і гени, які підвищують ріст рослин, такі як ген глутаматдегідрогенази, що індукується амонієм. Гени, що покращують привабливість культур, включають, наприклад, гени, які дозволяють рослинам мати знижений вміст насичених жирів, гени, які підвищують поживну цінність рослин, і гени, які підвищують вміст білка в зерні. Генами, які покращують витривалість до засолення, є гени, що дозволяють підвищити ріст або забезпечують можливість росту рослини в середовищі з вищою солоністю, ніж природне навколишнє середовище рослини, в яку були введені ген(и) витривалості до засолення.

Також передбачаються способи ідентифікації регуляторних елементів (наприклад, промоторів, термінаторів і енхансерів). Під "регуляторним елементом" або "регуляторною ділянкою" мається на увазі частина нуклеїнової кислоти, що знаходиться вище або нижче гена, яка може складатися із ДНК або РНК або ДНК і РНК, і яка залучена у експресію гена. Регуляторні елементи можуть бути здатні опосередковувати органоспецифічність або контролювати активацію генів залежно від періоду розвитку або часового періоду та включають промоторні елементи, корові промоторні елементи, елементи, індукція яких відбувається у відповідь на зовнішній стимул, елементи, які активуються конститутивно, термінатори транскрипції, сигнали поліаденілювання та елементи, які знижують або підвищують активність промотора, такі як негативні регуляторні елементи або транскрипційні енхансери, відповідно. Під "цис-діючою" мається на увазі послідовність, яка є фізично суміжною із послідовністю, що транскрибується. Цис-діючі послідовності, як правило, взаємодіють із білками або іншими молекулами для здійснення (вмикання/вимикання, регулювання, модуляції і т.д.) транскрипції. Під "транскрипційним енхансером" мається на увазі послідовність нуклеїнової кислоти, яка, розташовуючись поблизу промотора та знаходячись у транскрипційному середовищі, здатна підтримувати транскрипцію, забезпечуючи підвищену транскрипційну активність у порівнянні з активністю, отриманою в результаті від промотора за відсутності енхансера. Енхансери можуть функціонувати вище, в межах або нижче відносно гена навіть на відстані 50 кілобаз від сайту ініціації транскрипції. Енхансери також можуть функціонувати незалежно від їхньої орієнтації. Під "термінатором транскрипції" мають на увазі послідовність ДНК, яка включає послідовність пар нуклеотидних основ, необхідну для зниження або усунення транскрипції. Під "сигналом поліаденілювання" мається на увазі послідовність, що керує термінацією транскрипції та трансляції.

Регуляторні послідовності для застосування у рослинах можна клонувати із сої шляхом конструювання одного або декількох ПЛР праймерів на основі послідовності гена рослини або регуляторного елемента. Спосіб може передбачати конструювання щонайменше одного праймера, здатного до гібридизації з нуклеотидною послідовністю із рослини, застосування праймера для ампліфікації ДНК із рослини сої із одержанням ампліфікованої ДНК і тестування ампліфікованої ДНК на активність регуляторної послідовності. Під "активністю регуляторної послідовності" мається на увазі здатність впливати на транскрипцію або трансляцію гена. Вона

включає промоторну активність, активність транскрипційного ехансера, активність щодо термінації транскрипції та активність щодо поліаденілювання. Способи вимірювання або визначення промоторної активності добре відомі у рівні техніки (див. розділ під назвою "Оцінка промоторної активності"). Способи вимірювання або тестування ехансерної активності добре відомі у рівні техніки (див., наприклад, патенти США №№ 6806064, 6818757 і 6784289). Способи вимірювання або тестування термінаторної активності добре відомі у рівні техніки (див., наприклад, патент США № 5093252). Способи вимірювання або тестування активності стосовно поліаденілювання добре відомі у рівні техніки (див., наприклад, патент США № 6632637).

В якості альтернативи, регуляторні елементи можна ідентифікувати та клонувати за допомогою інших підходів. Наприклад, геномні або субгеномні бібліотеки сої можна сконструювати із використанням векторів на основі ВАС, космід або фага лямбда. Бібліотеки можна піддати зондуванню з використанням промоторних елементів із рослин. В якості альтернативи, бібліотеки можна піддати зондуванню із використанням кодуючих ділянок гена із рослини. Отримані клони можна секвенувати та визначити цис-діючі елементи, що оточують кодуючі ділянки сої. В якості альтернативи, фрагменти із кодуючих ділянок різних генів сої можна ампліфікувати із геномної ДНК за допомогою ПЛР із використанням праймерів, сконструйованих із консервативних ділянок генів рослин, таких як консервативні ділянки з маїсу. Фрагменти кодуючих ділянок сої можна використовувати для дослідження геномних бібліотек, як описано.

Цис-діючі елементи можна клонувати за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією. Послідовність кодуючих ділянок генів сої можна одержати, як описано вище, потім сконструювати праймери для ПЛР і використовувати ПЛР зі зворотною транскрипцією для клонування ДНК, що фланкує кодуючі ділянки, з використанням методик, добре відомих у рівні техніки.

Антисенсова послідовність

Гетерологічна нуклеотидна послідовність, яка функціонально пов'язана із промотором сої, розкритим у даному документі, може являти собою антисенсову нуклеотидну послідовність для цільового гена. Під "антисенсовою нуклеотидною послідовністю" мається на увазі послідовність, яка перебуває у зворотній орієнтації щодо нормальної орієнтації 5'-3' даної нуклеотидної послідовності. Експресія антисенсової послідовності ДНК у рослинній клітині перешкоджає нормальній експресії цільового гена. Антисенсова нуклеотидна послідовність кодує РНК-транскрипт, який є комплементарним і здатним до гібридизації із ендегенними матричними РНК (мРНК), виробленими в результаті транскрипції цільового гена. Таким чином, продукування нативного білка, що кодується цільовим геном, пригнічується та досягається бажана фенотипова відповідь. Модифікації за допомогою антисенсових послідовностей можуть бути здійснені, оскільки послідовності гібридизуються з відповідною мРНК і перешкоджають її експресії. Можна використовувати антисенсові конструкції, послідовність яких приблизно на 70 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентична відповідним антисенсовим послідовностям. Крім того, ділянки антисенсових нуклеотидів можна використовувати для порушення експресії цільового гена. Як правило, можна використовувати послідовності щонайменше з 50 суміжних нуклеотидів, 100 суміжних нуклеотидів, 200 суміжних нуклеотидів або більше. Таким чином, промоторні послідовності, розкриті в даному документі, можуть бути функціонально пов'язані із антисенсовими послідовностями ДНК з метою зниження або пригнічення експресії нативного білка в рослині.

Експресійні касети та вектори трансформації рослин

Трансформацію рослинних клітин можна здійснювати одним з декількох способів, відомих у рівні техніки. Під "рослиною" маються на увазі цілі рослини, органи рослин (наприклад, листя, стебла, коріння і т.д.), насіння, рослинні клітини, пагони, зародки та їх потомство. Рослинні клітини можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, калюс, суспензійна культура клітин, протопласти, клітини листя, клітини кореня, клітини флоєми, пилки). "Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини належать до рослин, що мають екзогенні послідовності нуклеїнової кислоти або фрагменти ДНК, вбудовані або інтегровані в рослинну клітину. Під "стабільною трансформацією" мається на увазі, що нуклеотидна конструкція, введена в рослину, інтегрується в геном рослини та здатна успадковуватися її потомством.

Промоторна послідовність за даним винаходом може забезпечуватися у вигляді експресійної касети, що дозволяє їй керувати експресією гетерологічної послідовності, що становить інтерес, в рослинних клітинах. Під "експресійною касетою" мається на увазі конструкція ДНК, яка здатна приводити до експресії білка з відкритої рамки зчитування в клітині. Касета буде включати в 5'-3' напрямку транскрипції ділянку ініціації транскрипції, що включає

одну із промоторних нуклеотидних послідовностей, розкритих у даному документі, або їх варіанти або фрагменти, функціонально пов'язані з гетерологічною послідовністю, що становить інтерес, і ділянку термінації трансляції та транскрипції (тобто ділянку термінації), функціональну у рослинах. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген, який потрібно котрансформувати в організм, такий як селективний маркерний ген. У якості альтернативи, додатковий ген(и) можна забезпечити на декількох експресійних касетах. Така експресійна касета оснащена декількома сайтами рестрикції для вставки гетерологічної послідовності, що становить інтерес, під транскрипційним контролем регуляторних ділянок.

Часто такі конструкції також будуть містити 5' і 3' ділянки, що не транслюються. Такі конструкції можуть також містити трансльовану "сигнальну послідовність" або "лідерну послідовність" для полегшення котрансляційного або посттрансляційного транспорту пептиду, що становить інтерес, до певних внутрішньоклітинних структур, таких як хлоропласт (або інший тип пластид), ендоплазматичний ретикулум або апарат Гольджі, або для подальшої секреції. Наприклад, ген може бути сконструйований таким чином, щоб містити сигнальний пептид для полегшення транспорту пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Також може бути переважним конструювання експресійної касети для рослин, що містить інтрон так, щоб процесинг мРНК інтрона був необхідний для експресії. Під "сигнальною послідовністю" мають на увазі послідовність, про яку відомо або передбачається, що вона приводить до котрансляційного або посттрансляційного транспорту пептиду через клітинну мембрану. У еукаріотів це зазвичай включає секрецію в апарат Гольджі із одержанням у результаті певного глікозилювання. Під "лідерною послідовністю" мають на увазі будь-яку послідовність, яка в результаті трансляції приводить до утворення амінокислотної послідовності, достатньої для запуску котрансляційного транспорту пептидного ланцюга до внутрішньоклітинної органели. Таким чином, це поняття включає спрямований лідерними послідовностями транспорт і/або глікозилювання під час проходження в ендоплазматичний ретикулум, проходження у вакуолі, пластиди, у тому числі хлоропласти, мітохондрії і т.п.

Під "3'-ділянкою, що не транслюється", мається на увазі нуклеотидна послідовність, розташована нижче щодо кодуєчої послідовності. Сигнальні послідовності поліаденілювання та інші послідовності, що кодують регуляторні сигнали, здатні впливати на додавання трактів поліаденілової кислоти до 3' кінця попередника мРНК, являють собою 3'-ділянки, що не транслюються. Під "5'-ділянкою, що не транслюється", мається на увазі нуклеотидна послідовність, розташована вище щодо кодуєчої послідовності. Інші елементи, що не транслюються, розташовані вище або нижче, включають енхансери. Енхансери являють собою нуклеотидні послідовності, за допомогою яких здійснюється підвищення експресії промоторної ділянки. Енхансери добре відомі у рівні техніки та включають без обмеження енхансерну ділянку SV40 і енхансерний елемент 35S.

Ділянка термінації транскрипції може бути нативною щодо ділянки ініціації транскрипції, що містить промоторну нуклеотидну послідовність за даним винаходом, може бути нативною щодо послідовності ДНК, що становить інтерес, або може бути отримана з іншого джерела. Придатні ділянки термінації доступні із *Ti*-плазмід *A. tumefaciens*, такі як ділянки термінації транскрипції генів октопін-синтази та нопалін-синтази. Див. також, Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; і Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Якщо це доцільно, ген(и), що представляє(ють) інтерес, можна оптимізувати з метою підвищення експресії у трансформованій клітині-хазяїні. Тобто гени можна синтезувати з використанням переважних для клітини-хазяїна кодонів для покращеної експресії, або їх можна синтезувати із використанням кодонів відповідно до переважної для хазяїна частоти використання кодонів. Як правило, вміст GC у складі гена буде підвищеним. Див., наприклад, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11, для обговорення використання переважних для хазяїна кодонів. Способи синтезу переважних для рослин генів відомі у рівні техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 6320100, 6075185, 5380831 і 5436391; опубліковані заявки на патент США № 20040005600 і № 20010003849; і Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включені в даний документ за допомогою посилання.

В одному варіанті здійснення даного винаходу, нуклеїнові кислоти, що становлять інтерес, направляються у хлоропласт для експресії. Таким чином, у випадку, коли нуклеїнова кислота, що становить інтерес, не введена безпосередньо в хлоропласт, експресійна касета буде додатково містити нуклеїнову кислоту, що кодує транзитний пептид або сигнальну послідовність для спрямування продукту гена, що становить інтерес, у хлоропласти. Такі транзитні пептиди відомі у рівні техніки. Див., наприклад, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126;

Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; i Shah et al. (1986) Science 233:478-481.

Нуклеїнові кислоти, що становлять інтерес, які потрібно направити в хлоропласт, можуть бути оптимізовані для експресії в хлоропластах з урахуванням відмінностей використання кодонів між ядром рослини та цією органелою. У цьому випадку, нуклеїнові кислоти, що становлять інтерес, можуть бути синтезовані із використанням кодонів, переважних для хлоропластів. Див., наприклад, патент США № 5380831, включений у даний документ за допомогою посилання.

Як правило, ця "експресійна касета для рослин" буде вставлена у "вектор для трансформації рослин". Під "вектором для трансформації" мається на увазі молекула ДНК, необхідна для ефективної трансформації клітини. Така молекула може складатися з однієї або декількох експресійних касет і може бути організована у більш ніж одну "векторну" молекулу ДНК. Наприклад, бінарні вектори являють собою вектори для трансформації рослин, в яких використовуються два несуміжні ДНК-вектори для кодування всіх необхідних цис- і транс-діючих функцій для трансформації рослинних клітин (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Вектор" відноситься до конструкції нуклеїнової кислоти, призначеної для передачі між різними клітинами-хазяїнами. "Експресійний вектор" відноситься до вектора, здатного до вбудовування, інтеграції та експресії гетерологічних послідовностей або фрагментів ДНК у чужорідній клітині. Під "введенням" мається на увазі надання організму, який потрібно трансформувати, нуклеотидної конструкції таким чином, щоб конструкція отримувала доступ до внутрішнього простору щонайменше однієї клітини організму.

Цей вектор для трансформації рослин може складатися з одного або декількох ДНК векторів, необхідних для досягнення трансформації рослини. Наприклад, загальноприйнятою практикою у даній галузі техніки є застосування векторів для трансформації рослин, які складаються з одного або декількох суміжних сегментів ДНК. У даній галузі техніки ці вектори часто називають "бінарними векторами". Бінарні вектори, а також вектори із хелперними плазмідами, найчастіше використовуються для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, де розмір і складність сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективної трансформації, є досить великими, та доцільно розділити функції між окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори зазвичай містять плазмідний вектор, що містить цис-діючі послідовності, необхідні для переносу Т-ДНК (наприклад, ліву граничну ділянку та праву граничну ділянку), маркер селекції, що сконструйований із можливістю його експресії в рослинній клітині, та "ген, що становить інтерес" (ген, сконструйований із можливістю експресії в рослинній клітині, з якої є бажаним одержання трансгенних рослин). Також на даному плазмідному векторі присутні послідовності, необхідні для реплікації бактерій.

Цис-діючі послідовності розташовані таким чином, щоб сприяти ефективному переносу в рослинні клітини й експресії в них. Наприклад, маркерний ген селекції та ген, що становить інтерес, розташовані між лівою та правою граничними ділянками. Часто, другий плазмідний вектор містить транс-діючі фактори, які опосередковують перенос Т-ДНК із *Agrobacterium* у рослинні клітини. Ця плазміда часто містить функціональні елементи вірулентності (Vir гени), які забезпечують можливість інфікування рослинних клітин *Agrobacterium* і переносу ДНК шляхом розщеплення послідовностей граничних областей і vir-опосередкованого переносу ДНК, як цей процес розуміється в даній галузі техніки (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451). Кілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 і т.д.) можна використовувати для трансформації рослин. Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослин іншими способами, такими як бомбардування мікрочастинками, мікроін'єкція, електропорація, трансформація із використанням поліетиленгліколю і т.д.

Трансформація рослин

Способи за даним винаходом передбачають введення нуклеотидної конструкції в рослину. Під "введенням" мається на увазі надання рослині нуклеотидної конструкції таким чином, що конструкція отримує доступ до внутрішнього простору клітини рослини. Способи за даним винаходом не вимагають використання конкретного способу введення нуклеотидної конструкції в рослину, головне, щоб нуклеотидна конструкція мала доступ до внутрішнього простору щонайменше однієї клітини рослини. Способи введення нуклеотидних конструкцій у рослини відомі в рівні техніки, у тому числі без обмеження способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та вірус-опосередковані способи.

Під "рослиною" маються на увазі цілі рослини, органи рослин (наприклад, листя, стебла, коріння і т.д.), насіння, рослинні клітини, пагони, зародки та їх потомство. Рослинні клітини

можуть бути диференційованими або недиференційованими (наприклад, калюс, суспензійна культура клітин, протопласти, клітини листя, клітини коріння, клітини флоєми, пиліок).

"Трансгенні рослини", або "трансформовані рослини", або "стабільно трансформовані" рослини, або клітини, або тканини відносяться до рослин із вбудованими або інтегрованими в рослинну клітину екзогенними послідовностями нуклеїнової кислоти або фрагментами ДНК. Ці послідовності нуклеїнової кислоти включають послідовності, які є екзогенними або відсутніми в нетрансформованій рослинній клітині, а також послідовності, які можуть бути ендегенними або бути присутніми у нетрансформованій рослинній клітині. "Гетерологічний", як правило, відноситься до послідовностей нуклеїнових кислот, які не є ендегенними для клітини або частини нативного геному, в якому вони знаходяться, а були додані в клітину за допомогою інфекції, трансфекції, мікроін'єкції, електропорації, бомбардування мікрочастинками або т.п.

Трансгенні рослини за даним винаходом експресують одну або кілька нових послідовностей токсину, описаних у даному документі. У різних варіантах здійснення даного винаходу трансгенна рослина також містить один або кілька додаткових генів стійкості до комах (наприклад, Cry1, такі як члени родин Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E і Cry1F; Cry2, такі як члени родини Cry2A; Cry9, такі як члени родин Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E і Cry9F; і т.д.). Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що трансгенна рослина може містити будь-який ген, що надає агрономічну властивість, що становить інтерес. У різних варіантах здійснення даного винаходу промотор за даним винаходом можна застосовувати для керування експресією одного або декількох генів, описаних у патентних публікаціях, наведених у Таблиці 1, зміст яких включено в даний документ у повному обсязі за допомогою посилання.

Таблиця 1

Ознака	Джерело
Ефективність використання води	WO 2000/073475
	WO 2009/150541
	WO 2009/150541
	WO 2012075429
	WO 2012077020
Ефективність використання азоту	WO 1995/009911
	WO 1997/030163
	WO 2007/092704
	WO 2007/076115
	WO 2005/103270
	WO 2002/002776
	WO 2008/051608
	WO 2008/112613
	WO 2009/015096
	WO 2009/061776
	WO 2009/105492
	WO 2009/105612
	WO 2009/117853
	WO 2010/006010
	WO 2009/117853
	WO 2009/061776
	WO 2009/015096
	WO 2009/105492
	WO 2009/105612
	WO 2010/053621
	WO 2010/053867
	WO 2010/077890
	WO 2010/086220
	WO 2010/111568
	WO 2010/140388
	WO 2010/007496
	WO 2011/022597
	WO 2011/022608
	WO 2012087140

Таблиця 1

Ознака	Джерело
Покращений фотосинтез	WO 2008/056915
	WO 2004/101751
Стійкість до нематод	WO 1995/020669
	WO 2001/051627
	WO 2008/139334
	WO 2008/095972
	WO 2006/085966
	WO 2003/033651
	WO 1999/060141
	WO 1998/012335
	WO 1996/030517
	WO 1993/018170
	WO 2008/095886
	WO 2008/095887
	WO 2008/095888
	WO 2008/095889
	WO 2008/095910
	WO 2008/095911
	WO 2008/095916
	WO 2008/095919
	WO 2008/095969
	WO 2008/095970
	WO 2008/095972
	WO 2008/110522
	WO 2008/139334
	WO 2008/152008
	WO 2010/077858
	WO 2010/091230
	WO 2010/102172
	WO 2010/106163
	WO 2011/082217
	WO 2011/003783
Зменшене розтріскування стручків	WO 2006/009649
	WO 2004/113542
	WO 1999/015680
	WO 1999/000502
	WO 1997/013865
	WO 1996/030529
	WO 1994/023043
Стійкість до попелиці	WO 2006/125065
	WO 1997/046080
	WO 2008/067043
	WO 2004/072109
	WO 2009/091860
	WO 2010036764
Стійкість до склеротинії	WO 2006/135717
	WO 2006/055851
	WO 2005/090578
	WO 2005/000007
	WO 2002/099385
	WO 2002/061043
Стійкість до ботритису	WO 2006/046861
	WO 2002/085105

Таблиця 1

Ознака	Джерело
Стійкість до бремії	US 20070022496
	WO 2000/063432
	WO 2004/049786
	WO 2009/111627
	WO 2009/111627
Стійкість до ервінії	WO 2004/049786
Стійкість до кластеровірусу	WO 2007/073167
	WO 2007/053015
	WO 2002/022836
Витривалість до стресу (у тому числі витривалість до посухи)	WO 2010/019838
	WO 2009/049110
	WO 2008/002480
	WO 2005/033318
	WO 2008/002480
	WO 2008/005210
	WO 2008/006033
	WO 2008/008779
	WO 2008/022486
	WO 2008/025097
	WO 2008/027534
	WO 2008/027540
	WO 2008/037902
	WO 2008/046069
	WO 2008/053487
	WO 2008/057642
	WO 2008/061240
	WO 2008/064222
	WO 2008/064341
	WO 2008/073617
	WO 2008/074025
	WO 2008/076844
	WO 2008/096138
	WO 2008/110848
	WO 2008/116829
	WO 2008/117537
	WO 2008/121320
	WO 2008/125245
	WO 2008/142034
	WO 2008/142036
	WO 2008/150165
	WO 2008/092935
	WO 2008/145675
	WO 2009/010460
	WO 2009/016240
	WO 2009/031664
	WO 2009/038581
	WO 2009/049110
	WO 2009/053511
	WO 2009/054735
	WO 2009/067580
	WO 2009/073605
	WO 2009/077611

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	WO 2009/079508
	WO 2009/079529
	WO 2009/083958
	WO 2009/086229
	WO 2009/092009
	WO 2009/094401
	WO 2009/094527
	WO 2009/102965
	WO 2009/114733
	WO 2009/117448
	WO 2009/126359
	WO 2009/126462
	WO 2009/129162
	WO 2009/132057
	WO 2009/141824
	WO 2009/148330
	WO 2010/055024
	WO 2010/058428
	WO 2010/064934
	WO 2010/076756
	WO 2010/083178
	WO 2010/086221
	WO 2010/086277
	WO 2010/101818
	WO 2010/104848
	WO 2010/118338
	WO 2010/120017
	WO 2010/120054
	WO 2010/121316
	WO 2010/127579
	WO 2010/134654
	WO 2010/139993
	WO 2010/039750
	WO 2011/034968
	WO 2011/001286
	WO 2011/017492
	WO 2011/018662
	WO 2011/024065
	WO 2011/038389
	WO 2011/46772
	WO 2011/053897
	WO 2011/052169
	WO 2011/063706
	WO 2011/067745
	WO 2011/079277
	WO 2011/080674
	WO 2011/083290
	WO 2011/083298
	WO 2011/091764
	WO 2011/052169
	WO 2011/053897
	WO 2011/056769
	WO 2011/063706
	WO 2011/067745

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	WO 2011/083290
	WO 2011/083298
	WO 2011/091764
	WO 2011/096609
	WO 2011/122761
Стійкість до тобамовірусу	WO 2006/038794
	WO 2009086850
Врожайність	WO 2010/046221
	WO 2010/046471
	WO 2010/049897
	WO 2010/055837
	WO 2010/065867
	WO 2010/069847
	WO 2010/075143
	WO 2010/075243
	WO 2010/100595
	WO 2010/102220
	WO 2010/104092
	WO 2010/108836
	WO 2010/120862
	WO 2010/123667
	WO 2010/124953
	WO 2010/125036
	WO 2010/127969
	WO 2010/129501
	WO 2010/140388
	WO 2010/140672
	WO 2011/011273
	WO 2011/000466
	WO 2011/003800
	WO 2011/006717
	WO 2011/008510
	WO 2011/009801
	WO 2011/011412
	WO 2011/015985
	WO 2011/020746
	WO 2011/021190
	WO 2011/025514
	WO 2011/025515
	WO 2011/025516
	WO 2011/025840
	WO 2011/031680
	WO 2011/036160
	WO 2011/036232
	WO 2011/041796
	WO 2011/044254
	WO 2011/048009
	WO 2011/053898
	WO 2011/051120
	WO 2011/058029
	WO 2011/061656
	WO 2011/085062
	WO 2011/088065
	WO 2011/053898
	WO 2011/058029

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	WO 2011/061656
	WO 2011/085062
	WO 2011/088065
	WO 2011/095958
	WO 2011/097215
	WO 2011/099006
	WO 2011/104128
	WO 2011/104141
	WO 2011/104143
	WO 2011/104155
	WO 2011/106734
	WO 2011/106794
	WO 2011/109661
	WO 2011/114279
	WO 2011/114305
	WO 2011/114312
	WO 2011/114313
	WO 2011/117800
	WO 2011/135527
	WO 2011/136909
	WO 2011/139431
	WO 2011/140329
	WO 2011/146754
	WO 2011/147826
	WO 2011/157976
	WO 2011/161617
	WO 2011/161620
	WO 2011/109618
	WO 2011/159452
	WO 2012078949
	WO 2012083219
	WO 2012084742
	WO 2012084756
	WO 2012087903
	WO 2012087940
	WO 2012090500
	WO 2012091939
	WO 2012092106
	WO 2012092327
	WO 2012092573
	WO 2012092580
	WO 2012092596
	WO 2012093032
	WO 2012093833
	WO 2012097720
	WO 2012098517
	WO 2012102999
	WO 2012106321

Таблиця 1

Ознака	Джерело
Вміст/склад олії	WO 2010/045324
	WO 2010/053541
	WO 2010/130725
	WO 2010/140682
	WO 2011/006948
	WO 2011/049627
	WO 2011/060946
	WO 2011/062748
	WO 2011/064181
	WO 2011/064183
	WO 2011/075716
	WO 2011/079005
	WO 2011/049627
	WO 2011/062748
	WO 2011/064181
	WO 2011/064183
	WO 2011/079005
	WO 2011/146524
	WO 2011/161093
	WO 2011/163557
	WO 2011/163632
	WO 2011/163632
	WO 2012074385
	WO 2012074386
	WO 2012103452
Вироблення біофармацевтичних речовин	WO 2010/121818
	WO 2011/119115
Покращена рекомбінація	WO 2010/071418
	WO 2010/133616
Зовнішній вигляд рослин	WO 2010/069004
	WO 2011/060552
Боротьба із хворобами (інші)	WO 2010/059558
	WO 2010/075352
	WO 2010/075498
	WO 2010/085289
	WO 2010/085295
	WO 2010/085373
	WO 2009/000736
	WO 2009/065863
	WO 2009/112505
	WO 2010/089374
	WO 2010/120452
	WO 2010/123904
	WO 2010/135782
	WO 2011/025860
	WO 2011/041256
	WO 2011/031006
	WO 2011/031922
	WO 2011/075584
	WO 2011/075585
	WO 2011/075586
	WO 2011/075587
	WO 2011/075588
	WO 2011/084622

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	WO 2011/084626
	WO 2011/084627
	WO 2011/084629
	WO 2011/084630
	WO 2011/084631
	WO 2011/084314
	WO 2011/084324
	WO 2011/023571
	WO 2011/040880
	WO 2011/082304
	WO 2011/003783
	WO 2011/020797
	WO 2011/069953
	WO 2011/075584
	WO 2011/075585
	WO 2011/075586
	WO 2011/075587
	WO 2011/075588
	WO 2011/084314
	WO 2011/084324
	WO 2011/084622
	WO 2011/084626
	WO 2011/084627
	WO 2011/084629
	WO 2011/084630
	WO 2011/084631
	WO 2011/133892
	WO 2011/133895
	WO 2011/133896
	WO 2011/082217
	WO 2011/104153
	WO 2011/082304
	WO 2011/100650
	WO 2011/158242
	WO 2012003207
	WO 2012004013
	WO 2012004401
	WO 2012006271
	WO 2012006426
	WO 2012006439
	WO 2012006443
	WO 2012006622
	WO 2012007916
	WO 2012007919
	WO 2012009551
	WO 2012011034
	WO 2012012403
	WO 2012015039
	WO 2012058266
	WO 2012058458
	WO 2012058528
	WO 2012058730
	WO 2012061513
	WO 2012063200
	WO 2012065166

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	WO 2012065219
	WO 2012066008
	WO 2012067127
	WO 2012068966
	WO 2012071039
	WO 2012071040
Витривалість до гербіцидів	US 4761373
	US 5304732
	US 5331107
	US 5718079
	US 6211438
	US 6211439
	US 6222100
	US 2003/0217381
	US 2003/0217381
	WO 2004/106529
	WO 2000/27182
	WO 2005/20673
	WO 2001/85970
	US 5545822
	US 5736629
	US 5773703,
	US 5773704
	US 5952553
	US 6274796
	WO 2004/106529
	WO 2004/16073
	WO 2003/14357
	WO 2003/13225
	WO 2003/14356
	US 5188642
	US 4940835
	US 5633435
	US 5804425
	US 5627061.
	US 5646024
	US 5561236
	US 6333449
	US 6933111
	US 6468747.
	US 6376754
	US 7105724
	US 7105724
	WO 2008/051633
	US 7105724
	US 5670454
US 7105724	
US 7105724	
US 7105724	
US 7105724	
US 7105724	
US 5670454	
US 7105724	
US 7105724	
US 5670454	

Таблиця 1

Ознака	Джерело
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 6153401
	US 6100446
	WO 2005/107437
	US 5670454
	US 5608147
	US 5670454
	WO 2004/055191
	WO 199638567
	US 6791014
	US 2002/0073443,
	US 20080052798
	WO 2011/022470
	WO 2011/034936
	WO 2011/028832
	WO 2011/028833
	WO 2011/028836
	WO 2011/068567
	WO 2011/076345
	WO 2011/085221
	WO 2011/094199
	WO 2011/094205
	WO 2011/068567
	WO 2011/085221
	WO 2011/094199
	WO 2011/094205
	WO 2011/145015
	WO 2012047595
	WO 2012048124
	WO 2012048136
	WO 2012048807
	WO 2012049663
	WO 2012050962
	WO 2012056401
	WO 2012057466
	WO 2012057465
	WO 2012058223
Метаболізм рослин	WO 2011/060920
	WO 2011/119115
	WO 2011/102394
Розмноження	WO 2011/113839
Отримання біопалива	WO 2012073493
Дозрівання плодів	WO 2012073494
Якість волокна	WO 2012074386

- 5 Трансформацію рослинних клітин можна здійснювати одним або декількома способами, відомими у рівні техніки. Пестицидний ген за даним винаходом можна модифікувати для одержання або посилення експресії в рослинних клітинах. Як правило, конструкція, що експресує такий білок, міститиме промотор для керування транскрипцією гена, а також 3'-ділянку, що не транслюється, для забезпечення можливості термінації транскрипції та поліаденілювання. Будова таких конструкцій добре відома у рівні техніки. У деяких випадках корисним може бути конструювання гена таким чином, щоб отриманий пептид був секреторним

або яким-небудь іншим способом направлявся в рослинній клітині. Наприклад, ген можна сконструювати таким чином, щоб він містив сигнальний пептид для забезпечення транспорту пептиду в ендоплазматичний ретикулум. Переважним також може бути конструювання експресійної касети для рослин, що містить інтрон, так, щоб експресія потребувала процесинг мРНК інтрону.

Як правило, ця "експресійна касета для рослин" буде вставлена в "вектор для трансформації рослин". Цей вектор для трансформації рослин може складатися з одного або декількох ДНК векторів, необхідних для здійснення трансформації рослини. Наприклад, загальноприйнятою практикою в даній галузі техніки є застосування векторів для трансформації рослин, які складаються з більш ніж одного суміжного сегмента ДНК. Ці вектори часто згадуються в даній галузі техніки як "бінарні вектори". Бінарні вектори, а також вектори з хелперними плазмідами, найчастіше використовуються для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, де розмір і складність сегментів ДНК, необхідних для досягнення ефективної трансформації, досить великі, та доцільно розділити функції між окремими молекулами ДНК. Бінарні вектори зазвичай містять плазмідний вектор, що містить цис-діючі послідовності, необхідні для переносу Т-ДНК (наприклад, ліву та праву граничну ділянку), маркер селекції, розроблений з можливістю його експресії в рослинній клітині, та "ген, що становить інтерес" (ген, сконструйований із можливістю експресії в рослинній клітині, з якої є бажаним одержання трансгенних рослин). Також на даному плазмідному векторі присутні послідовності, необхідні для реплікації бактерій. Цис-діючі послідовності розташовані таким чином, щоб забезпечувати можливість ефективного переносу в рослинні клітини й експресії в них. Наприклад, маркерний ген селекції та пестицидний ген розташовані між лівою і правою граничними ділянками. Часто, другий плазмідний вектор містить транс-діючі фактори, які опосередковують перенос Т-ДНК із *Agrobacterium* у рослинні клітини. Ця плазміда часто містить функціональні елементи вірулентності (Vir-гени), що забезпечують можливість інфікування рослинних клітин *Agrobacterium* і переносу ДНК шляхом розщеплення послідовностей граничних областей і vir-опосередкованого переносу ДНК, як цей процес розуміється в даній галузі техніки (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science*, 5:446-451). Кілька типів штамів *Agrobacterium* (наприклад, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 і т.д.) можуть бути використані для трансформації рослин. Другий плазмідний вектор не є необхідним для трансформації рослин за допомогою інших способів, таких як бомбардування мікрочастинками, мікроін'єкція, електропорація, трансформація за допомогою поліетиленгліколю і т.д.

У цілому, способи трансформації рослин включають перенос гетерологічної ДНК у рослинні клітини-мішені (наприклад, незрілі або зрілі зародки, суспензійні культури, недиференційований калюс, протопласти і т.д.) із подальшим застосуванням максимального граничного рівня відповідного засобу селекції (залежно від маркерного гена селекції) з метою виділення трансформованих рослинних клітин із групи нетрансформованої клітинної маси. Експланти, як правило, переносять на свіжу порцію того ж самого поживного середовища та культивують із застосуванням стандартних підходів. В подальшому, після перенесення у регенераційне середовище, доповнене максимальним граничним рівнем засобу селекції, трансформовані клітини диференціюються в пагони. Потім пагони переносять на селективне середовище для вкорінення з метою виділення вкорінених пагонів або проростків. Потім трансгенна рослина виростає в зрілу рослину та продукує фертильне насіння (наприклад, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Експланти, як правило, переносять на свіжу порцію того ж самого поживного середовища й культивують із застосуванням стандартних підходів. Загальний опис методик і способів одержання трансгенних рослин можна знайти в Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239; і Votmineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Оскільки трансформований матеріал містить багато клітин, як трансформовані, так і нетрансформовані клітини присутні в будь-якій частині цільового калюса, або тканини, або групі клітин, що були піддані впливу. Можливість знищення нетрансформованих клітин і надання можливості трансформованим клітинам проліферувати приводить до отримання трансформованих рослинних культур. Часто можливість видалення нетрансформованих клітин є обмеженням для швидкого відновлення трансформованих рослинних клітин і успішного одержання трансгенних рослин.

Протоколи трансформації, як і протоколи для введення нуклеотидних послідовностей у рослини, можуть змінюватися залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто однодольних або дводольних, обраних для трансформації. Створення трансгенних рослин можна здійснювати за допомогою одного з декількох способів, у тому числі без обмеження за допомогою мікроін'єкції, електропорації, прямого переносу генів, введення гетерологічної ДНК у рослинні клітини за допомогою *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-опосередкованої трансформації),

бомбардування рослинних клітин гетерологічною чужорідною ДНК, прикріпленої на частинках, балістичного прискорення частинок, трансформації аерозольним потоком (опублікована заявка на патент США № 20010026941; патент США № 4945050; публікація міжнародної заявки № WO 91/00915; опублікована заявка на патент США № 2002015066), трансформації з використанням

5 Лес1, а також різних інших способів переносу ДНК, не опосередкованого використанням частинок.

Способи трансформації хлоропластів добре відомі у рівні техніки. Див., наприклад, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. Спосіб заснований на доставці з

10 використанням гармати частинок з ДНК, що містить селективний маркер, і цілеспрямованій доставці ДНК у геном пластиди шляхом гомологічної рекомбінації. Крім того, трансформацію пластид можна здійснювати шляхом трансактивації мовчазного пластидного трансгена шляхом тканиноспецифічної експресії РНК-полімерази, що кодується ядерним геномом та спрямовується в пластиди. Про таку систему повідомлялося в McBride et al. (1994) Proc. Natl.

15 Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Після інтеграції гетерологічної чужорідної ДНК у клітини рослин застосовують максимально допустимий граничний рівень відповідного засобу селекції у складі середовища для знищення нетрансформованих клітин, а також відокремлення та забезпечення проліферації ймовірно трансформованих клітин, які виживають після даної селекційної обробки, шляхом регулярного

20 переносу на свіже середовище. Шляхом безперервного пасажування та впливу відповідної селекції ідентифікують і забезпечують проліферацію клітин, трансформованих плазмідним вектором. Для підтвердження наявності інтегрованого гетерологічного гена, що становить інтерес, у геномі трансгенної рослини застосовують молекулярні та біохімічні способи.

Клітини, що були трансформовані, можна виростити у рослини відповідно до загальноприйнятих способів. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Ці рослини можна потім виростити та заплити або тією ж самою трансформованою лінією, або іншими лініями та ідентифікувати отриманий у результаті гібрид із конститутивною експресією

25 необхідної фенотипової ознаки. Два або більше поколінь можуть бути вирощені для підтвердження того, що експресія необхідної фенотипової характеристики стабільно зберігається та успадковується, а потім насіння можна зібрати для підтвердження того, що була досягнута експресія необхідної фенотипової характеристики. Таким чином, даний винахід передбачає одержання трансформованого насіння (що також згадується як "трансгенне насіння"), що містить нуклеотидну конструкцію за даним винаходом, наприклад, експресійну касету за даним винаходом, стабільно вбудовану в їхній геном.

Рослини

Даний винахід можна застосовувати для трансформації будь-яких видів рослин, у тому числі без обмеження дводольних і однодольних. Приклади рослин, що становлять інтерес, включають без обмеження кукурудзу (маїс), сорго, пшеницю, соняшник, томат, хрестоцвіті, перці, картоплю, бавовник, рис, сою, цукровий буряк, цукровий очерет, тютюн, ячмінь, олійний рапс, Brassica sp., люцерну, жито, просо, сафлор, арахіс, солодку картоплю, маніок, каву, кокос, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банан, авокадо, інжир, гуаяву, манго, оливу, папаю, кеш'ю, маकाдамію, мигдаль, овес, овочі, декоративні та хвойні рослини.

40

Овочі включають без обмеження томати, латук, зелені боби, лімську квасолю, горох і членів роду *Cucumis*, таких як огірок, диня та мускусна диня. Декоративні рослини включають без обмеження азалію, гортензію, гібіскус, троянди, тюльпани, нарциси, петунії, гвоздики, пуансетію та хризантему. Переважно, рослини за даним винаходом є сільськогосподарськими культурами (наприклад, маїс, сорго, пшениця, соняшник, томат, хрестоцвіті, перці, картопля, бавовник, рис, соя, цукровий буряк, цукровий очерет, тютюн, ячмінь, олійний рапс і т.д.).

45

Даний винахід є особливо придатним для будь-якого члена класу однодольних рослин, у тому числі без обмеження для маїсу, рису, ячменю, вівса, пшениці, сорго, жита, цукрового очерету, ананаса, ямсу, цибулі, банана, кокоса та фініка.

50

Оцінка трансформації рослин

Після введення гетерологічної чужорідної ДНК у рослинні клітини, трансформацію або інтеграцію гетерологічної ДНК у геном рослини підтверджують за допомогою різних способів, таких як аналіз нуклеїнових кислот або білків і метаболітів, асоційованих з інтегрованою ДНК.

55

ПЛР-аналіз є швидким способом для скринінгу трансформованих клітин, тканин або пагонів на наявність вбудованої ДНК на ранній стадії до пересадження у ґрунт (Sambrook and Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЛР проводять із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів для

60 гена, що становить інтерес, або фонового елемента вектора *Agrobacterium*, без урахування

гена, що становить інтерес і т.д.

Трансформацію рослини можна підтвердити за допомогою аналізу геномної ДНК методом Саузерн-блотингу (Sambrook and Russell, 2001, вище). У цілому, загальну ДНК екстрагують із трансформанта, розщеплюють необхідними ферментами рестрикції, фракціонують в агарозному гелі та переносять на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Потім проводять зондування мембрани або "блота", наприклад, цільовим фрагментом ДНК, міченим радіоактивним ^{32}P , для підтвердження інтеграції введеної ДНК у геном рослини згідно зі стандартними методиками (Sambrook and Russell, 2001, вище).

У Нозерн-блот аналізі РНК виділяють із конкретних тканин трансформанта, фракціонують в агарозному гелі з формальдегідом, переносять промоканням на нейлоновий фільтр згідно зі стандартними методиками, які звичайно використовуються у даній галузі техніки (Sambrook and Russell, 2001, вище). Експресію РНК, що кодується гетерологічним геном, функціонально пов'язаним із промотором TrpPro5, потім перевіряють шляхом гібридизації фільтра з радіоактивним зондом, отриманим із гетерологічного гена способами, відомими у рівні техніки (Sambrook and Russell, 2001, вище).

Оцінка промоторної активності

Доступні численні способи оцінки промоторної активності в рослинах. Функціонування промотора під час експресії гена, що становить інтерес та знаходиться під його регуляторним контролем, можна досліджувати або на етапі транскрипції, або на етапі трансляції. На етапі транскрипції рівні РНК можна досліджувати за допомогою аналізів гібридизації ДНК-РНК (тобто Нозерн-блот аналізу), конкурентної ПЛР зі зворотною транскрипцією й аналізу із захистом від РНКаз. На етапі транскрипції промоторну активність можна визначити із використанням специфічних функціональних аналізів для синтезованого білка (наприклад, ферментативної активності або за допомогою імунологічного аналізу білка). Наприклад, активність репортерного гена, як наприклад, β -глюкуронідазна активність, люциферазна активність або флуоресценція GFP, можна відслідковувати в різні моменти часу після трансформації. Активність репортерного гена можна відслідковувати за ферментативною активністю, шляхом фарбування клітин або тканин субстратом для ферменту, що кодується репортерним геном, або шляхом прямої візуалізації за відповідної довжини хвилі світла (див., наприклад, Wang et al. (2000) Plant Science 156:201-211). Вестерн-блотинг можна проводити для трансгенних рослин з метою підтвердження наявності білка, що кодується геном, що становить інтерес, функціонально пов'язаним із промотором TrpPro5, відповідно до стандартних процедур (Sambrook and Russell, 2001, вище) із використанням антитіл, які зв'язуються з одним або декількома епітопами білка. Можна визначити повнорозмірні промоторні послідовності, делеції та мутації промоторної послідовності та порівняти рівні їх експресії. Див., наприклад, патент США № 6072050; і Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), включені в даний документ за допомогою посилання.

Наступні приклади пропонуються для ілюстрації, а не в якості обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1. Ідентифікація конститутивних промоторів сої

Загальнодоступні бази даних транскриптому сої використовували для ідентифікації генів, що експресуються на високому рівні в різних тканинах (листя, стручок, квіти, коріння і т.д.). Промоторні ділянки (вище відносно першого ATG) цих генів ампліфікували за допомогою ПЛР із геномної ДНК сої (Jack) і зчіплювали з кодуючою ділянкою гена люциферази та термінатором PinII. Ці промотор-вмісні вектори трансформували в *Agrobacterium*. Трансформовані *Agrobacterium* використовували для просочування листових дисків молодшої сої або квасолі. Після 2 днів інкубації при 25 °C за 16-годинного освітлення листові диски гомогенізували в буфері PBS для екстракції білка. Далі розчинні білки аналізували на активність люциферази із використанням системи аналізу люциферазної активності STEADY-GLO® від Promega. Люциферазна активність, що являє собою середнє значення трьох незалежних наборів просочених листових дисків сої для кожного вектора, показана на Фігурі 1. Pbdc6 і Pbdc7 показали активність, порівнянну з Pubi3 із *Arabidopsis*. Pbdc6 (SEQ ID NO:1) одержували з Glyma03g34310, який кодує внутрішній білок тонопласта гама. Pbdc7 (SEQ ID NO: 2) одержували з Glyma23g42220, який кодує внутрішній білок плазматичної мембрани.

Приклад 2. Аналіз in planta

Послідовності ДНК, що містять промотори Pbdc6 і Pbdc7, відповідно, клонували в pSZ8133 для зчеплення цих промоторів з grg23Ace5. Отримані бінарні вектори, pSZ8806 і pSZ8807, трансформували в *Agrobacterium* LBA4404 і використовували для одержання трансгенних рослин сої. Приблизно 150 трансгенних трансформантів для кожного вектора аналізували

шляхом обприскування 4X гліфосатом. Стійкість до 4X гліфосату оцінювали через тиждень після обприскування (таблиця 2, 0 означає відсутність стійкості, а 4 відображає найсильнішу стійкість). UBQ3 використовували в якості контролю. Pbdc6 і Pbdc7 знову показували рівень стійкості, порівняний з Pubi3At.

5

Таблица 2

Стійкість до 4х гліфосату (представлена як відсоток рослин, оцінений для кожної з категорій)

Вектори	Промотори	0	1+	2+	3+	2+ або 3+
pSZ8133	Pubi3At	50 %	14 %	20 %	16 %	36 %
pSZ8806	Pbdc6	54 %	8 %	24 %	14 %	39 %
pSZ8807	Pbdc7	44 %	13 %	21 %	22 %	43 %

Усі публікації та заявки на патенти, згадані в описі, указують на рівень кваліфікації фахівців у даній галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Усі публікації та заявки на патенти включені в даний документ за допомогою посилання в тій же мірі, як ніби кожна окрема публікація або патентна заявка була конкретно й окремо зазначена як включена за допомогою посилання.

Незважаючи на те, що даний винахід був описаний у деяких деталях для ілюстрації та прикладу з метою ясності розуміння, буде очевидним, що певні зміни та модифікації можуть бути здійснені в межах обсягу доданої формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БАЙЕР КРОПСАЕНС ЛП
Чжан, Шіжун

<120> КОНСТИТУТИВНІ ПРОМОТОРИ СОЇ

<130> 2912939-20179W001

<160> 2

<170> PatentIn версія 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

$\langle 211 \rangle$ 1230

<212> ДНК

<213> Glycine max

 $\langle 400 \rangle$ 1

ctcgaaacag aatatagcag tgattccagg tgcacggtgc cacctgtttg ctaaaaaaca 60

aaaataattg aggggggttaa ctaagctaata ccaaaccaga gatcagagcg ggagattaat 120

tttaataatt ctcttagtct cttcattaag atcctttttt tcatatcaag ttaaacttta 180

tgcaaaatat catattttca tttcagaaaa acaaaaaaagc tactgtacat acaacattaa 240

gtttaaaata aacaagtaca gtttaccac gtgtcagtcg cggctcttgta ataatacctg 300

cttttttccg gtgggtcacc agagagtcac agtgcttata cccttatctc attcattata 360

ttatgatgaa ttatgccctt ataattatag attaactact actttgcagt tataaactta 420

aaattcacaa ttctctctat tattttctttg cacacgcgat ataataataaa actctagaagc 480

tatcgtcatt cacaaacttta aaaaaatttaa aaaagttaat tatattagag tgcaatagct 540

cactctcttt ctctcacgga accatccaga tatacaaaaa agactagaca atgtccactt 600

	atcagcgccc tacatggctc ttatccatct cggacacgtg tcagtcctgg gacggctctg	660
5	gcccaaacga ttcgctgtct taagagcaac caacagtgat gtggggatat actccttggt	720
	ttttttttct tcaaataatt atgtataatg tattttataat ataatttttt tactttttaa	780
	ataattattc tgtatagttt cgatgataat ttatgctaaa tgtttatgta aaattattta	840
10	cactttttta tacatagaca ttaacttttt ttctctcata aatgttttaa ataaaaggaa	900
	aaacaattaa taatttgaaa tgaagaacct gtcccaggct gtcaccaa ataggattcttt	960
15	cttttcgggc ttggtgtttt tgaaaaactt gattcctgac atttttggaa gcattgcgca	1020
	tattttccaa ataggaaaat aaaaataacc gggaaccggg tacagccggt ggaatcctag	1080
	gcaggctcgt cttcaatcac ggtatataag aagctacgaa gcgaaaacga atagcatagc	1140
20	gaaacagaga gtgggtttcag tgagtgatcg gtgttcactt gatccttcat aagtcgtcat	1200
	catcatcatc atcatcaccg ttgattgaag	1230
25	<210> 2 <211> 1688 <212> ДНК <213> Glycine max	
30	<400> 2 ctaacgtttt tggctcacia ctcaaactga tcaagaacct ttcattttat taacgttata	60
	cttacaagtc actcagacta atcaaggcac taaactaatg catattaggt aatgcaaata	120
35	aataatgacg ctcccatgaa tattcaaatg gtttcttttg ctttttgctt aacgactttt	180
	gtatctctac gaattacttg agaaaaagct gctattatta ttatccaact atataaacia	240
40	atgaaagcta cagttaagga catggcctat taacaatata tgtagacttg atcattgtct	300
	catccacgag atagaaacia aatatataaa agggctcatt atgcttattt agttcaagga	360
	agagaggaaa atgagttatg catgtagcca gaatgaacat ttgatcatgg acgtgagata	420
45	agttaatcgc tgacagccat gtgccgacca tgtttttata aatgaaaaga aagaaagaaa	480
	tgttcgtata taataattta cgggcacaag aaccttggtta ataattatca ttatcttttt	540
50	tttttttctg aaaaccttgt ttctctaata attgatgtat atttgtaata tctctccaac	600
	tccttaccat gtagtgagga gtgaatttca tattaacatt ggtcattaca atattatcaa	660
	ctttcgcgct aaatcagaat atatatataa tttcgcgcta aatattctta aaatattggg	720
55	attttggtag gtaaagattt acaatcacga ataagtaata aagaattttt catacgcat	780
	caatgattcc gaccatgtgt tatttgtttt gaaataccta tatgagagac tgagagcatc	840
60	ttgttattta tgactgctta ttaattttcc cttcatgcct tatctaatta gtttaaatat	900
	attatttctc cttgtataaa aaaaaattat gatttctcca accatacata ttagagaata	960

	acttgaaatt atattcaacg tattaattgc attaccttta acgtgccaaa ataataaata	1020
5	aaactaaaaa ctactacaat cataaatcgc gtgtggttga attgagacaa attctattct	1080
	aaaaaagaaa aacattaaca aaaagagaaa gaaaaaaaaa attgttgaca cctgacagcg	1140
	gtaacagggg agtagcggta ggagattggc gtgtcggttt ccaactctgg aatccaacgt	1200
10	gccaaactga gaatgcagga gaaagagaca cgtgtccaat tgcaggcgcg agttcaacgt	1260
	gacaattcga aagccttgac aatcgcaccg cccagcatcg aacgcagaca aggaccacgt	1320
15	ggaattcggg ccctgtatcc gtcaaaacgt tttttaccct cttcttcttc agttcttcca	1380
	tttttatttt tttttcaaac cacagtaatc cacgttccag tgctgcgcgg aacatggtcg	1440
	gtctttctag gagtggttgg aatcccgcca gctaggacaa accccatcaa tcattggtcc	1500
20	ccatcaaaca aaaacatttt taaaaattca acatattacg ccacgggacc cacctccac	1560
	cacccctcac cctcacttct attaactcaa acctattccg gttataaatc cgcaaccctc	1620
25	gttcttacta actcactcac tcacaactca gtgaaagaga atccgaggcg aagagaagag	1680
	aaaaatta	1688

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 30 1. Експресійна касета, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, функціонально зв'язану з гетерологічною нуклеїновою кислотою, де вказану нуклеотидну послідовність вибирають із групи, що складається з:
 - (а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 2; та
 - (b) нуклеотидної послідовності, яка принаймні на 99 % ідентична до послідовності, викладеної в
- 35 SEQ ID NO: 2,
 де вказана послідовність ініціює транскрипцію гетерологічної нуклеїнової кислоти в рослинній клітині.
2. Вектор, який містить експресійну касету за пунктом 1.
3. Рослинна клітина, що має у своєму геномі стабільно вбудовану експресійну касету за пунктом
- 40 1, де вказана нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з гетерологічною нуклеїновою кислотою, що становить інтерес.
4. Рослинна клітина за пунктом 3, де вказана рослинна клітина походить із дводольної рослини.
5. Рослинна клітина за пунктом 4, де вказана дводольна рослина являє собою сою.
6. Рослина, що має у своєму геномі стабільно вбудовану експресійну касету за пунктом 1, де
- 45 вказана нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з гетерологічною нуклеїновою кислотою, що становить інтерес.
7. Рослина за пунктом 6, де вказана рослина являє собою дводольну рослину.
8. Рослина за пунктом 7, де вказана дводольна рослина являє собою сою.
9. Трансгенне насіння, що містить експресійну касету за пунктом 1.
- 50 10. Рослина за пунктом 6, де гетерологічна нуклеїнова кислота, що становить інтерес, кодує генний продукт, який надає стійкість до гербіцидів, засолення, патогенів або шкідників.
11. Спосіб експресії гетерологічної нуклеїнової кислоти, що становить інтерес, в рослині, де вказаний спосіб передбачає введення в рослинну клітину експресійної касети, що містить
- промотор, функціонально зв'язаний з гетерологічною нуклеїновою кислотою, що становить
- 55 інтерес, де вказаний промотор містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з:
 - (а) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 2; та
 - (b) нуклеотидної послідовності, яка принаймні на 99 % ідентична до послідовності, викладеної в
- 60 SEQ ID NO: 2,
 де вказана нуклеотидна послідовність ініціює транскрипцію гетерологічної нуклеїнової кислоти, що становить інтерес, в рослинній клітині; та,

регенерацію трансформованої рослини з вказаної рослинної клітини, де вказана рослина містить у своєму геномі стабільно вбудовану вказану експресійну касету.

12. Спосіб за пунктом 11, де вказана рослина являє собою однодольну рослину.

13. Спосіб за пунктом 11, де вказана рослина являє собою дводольну рослину.

5 14. Спосіб за пунктом 12, де вказана однодольна рослина являє собою маїс.

15. Спосіб за пунктом 11, де вказана гетерологічна нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який надає толерантність до гербіцидів або резистентність до шкідників.

16. Спосіб експресії гетерологічної нуклеїнової кислоти, що становить інтерес, в рослинній клітині, де вказаний спосіб передбачає введення в рослинну клітину експресійної касети, що містить промотор, функціонально зв'язаний з гетерологічною нуклеїновою кислотою, що становить інтерес, де вказаний промотор містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з:

(a) нуклеотидної послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 2; та

(b) нуклеотидної послідовності, яка принаймні на 99 % ідентична до послідовності, викладеної в SEQ ID NO: 2,

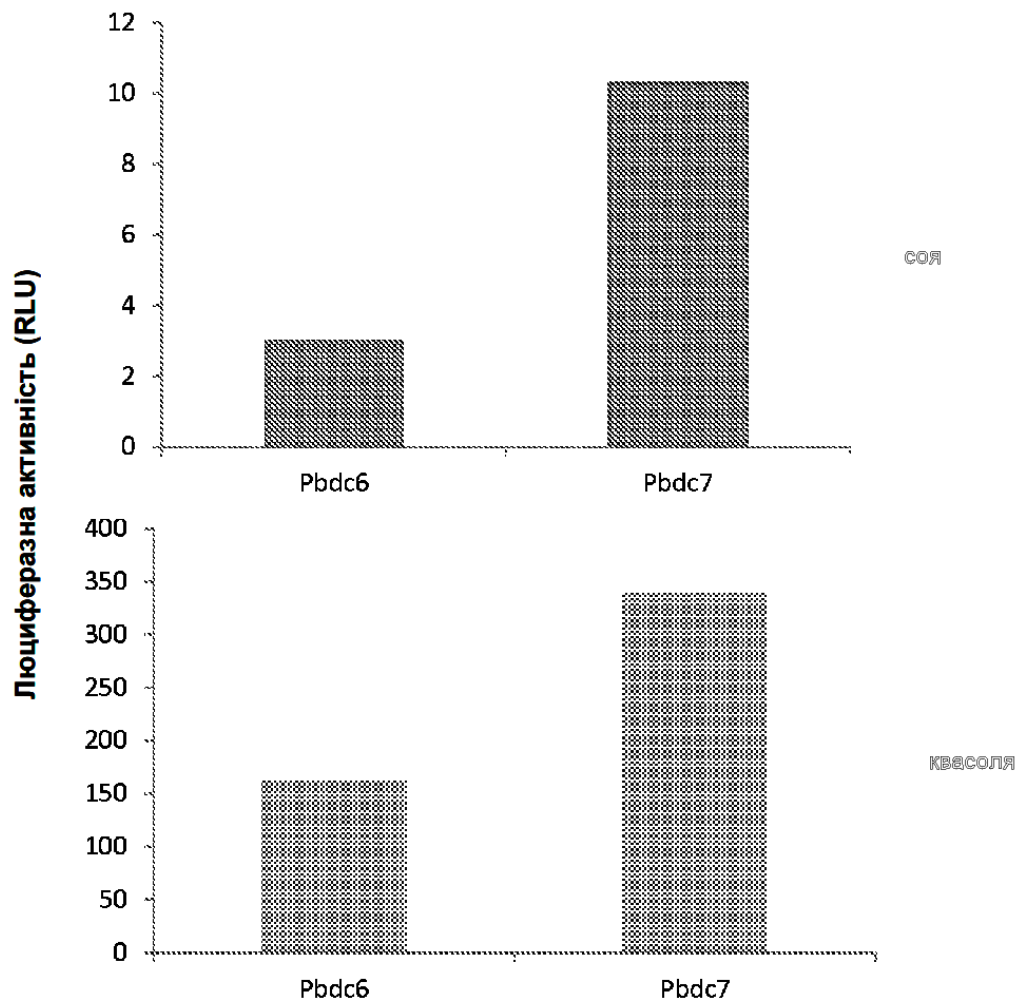
15 де вказана послідовність ініціює транскрипцію гетерологічної нуклеїнової кислоти, що становить інтерес в рослинній клітині.

17. Спосіб за пунктом 16, де вказана рослинна клітина являє собою однодольну рослинну клітину.

20 18. Спосіб за пунктом 16, де вказана рослинна клітина являє собою дводольну рослинну клітину.

19. Спосіб за пунктом 17, де вказана однодольна рослина являє собою маїс.

20. Спосіб за пунктом 16, де гетерологічна нуклеїнова кислота кодує генний продукт, який надає толерантність до гербіцидів або резистентність до шкідників.



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601