

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034330**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.29

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
201491810

(22) Дата подачи заявки
2013.03.28

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК, ПРИДАЮЩЕЙ РАСТЕНИЮ КУКУРУЗЫ УСТОЙЧИВОСТЬ К НАСЕКОМЫМ

(31) **61/617,990**

(32) **2012.04.24**

(33) **US**

(43) **2015.03.31**

(86) **PCT/US2013/034374**

(87) **WO 2013/149018 2013.10.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕНД
ИНТЕРНЭШНЛ. ИНК.; Е.И. ДЮПОН
ДЕ НЕМУР ЭНД КОМПАНИ (US)**

(56) **WO-A1-2011084621
WO-A1-2011075595**

APPENZELLER L.M. ET AL.: "Subchronic feeding study with genetically modified stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-01507-lxDAS-59122-7) maize grain in Sprague-Dawley rats", FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 47, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 1512-1520, XP026157644, ISSN: 0278-6915, DOI: 10.1016/J.FCT.2009.03.041 [retrieved on 2009-04-07] the whole document

(72) Изобретатель:
**Аларкон Клара М., Хармон Мэттью
С., Паскуаль Мария Алехандра,
Рэджистер Джеймс С. III, Силонж
Кристофер Дж., Янг Джошуа К., Чжун
Кати Сяоянь (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены ДНК-композиции, относящиеся к трансгенным растениям маиса, устойчивым к насекомым. Также предложены анализы для обнаружения наличия объекта маиса DP-004114-3 на основе последовательности ДНК рекомбинантного конструкта, введенного в геном маиса, и последовательностей ДНК, фланкирующих сайт вставки. Предложены наборы и условия, которые могут использоваться при проведении анализов.

B1**034330****034330****B1**

Перекрестная ссылка

В настоящей заявке на патент на изобретение испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/617990, поданной 30 марта 2012 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Ссылка на список последовательностей, представленных в электронном виде

Официальная копия списка последовательностей представлена в электронном виде через EFS-Web в виде файла со списком последовательностей в формате ASCII с наименованием 5251_PCT_sequence_listing.txt, созданного 08 марта 2013 г., имеющего размер 51 килобайт и поданного одновременно со спецификацией. Список последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Область применения изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к сфере молекулярной биологии растений, в частности, вариант осуществления настоящего изобретения относится к ДНК-конструкциям для придания растению устойчивости к насекомым. Более конкретно, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к объекту растения кукурузы DP-004114-3, устойчивому к насекомым, а также к анализам для обнаружения наличия объекта кукурузы DP-004114-3 в образце и его композициях.

Предпосылки создания изобретения

Вариант осуществления данного изобретения относится к устойчивому к насекомым растению кукурузы (*Zea mays*) DP-004114-3, также называемому "линия маиса DP-004114-3", "объект маиса DP-004114-3" и "маис 4114", а также к экспрессионному ДНК-конструкту растения кукурузы DP-004114-3 и обнаружению трансгенной/фланкирующей области вставки у растения кукурузы DP-004114-3 и его потомства.

Кукуруза является важной культурой и представляет собой основной источник пищи во многих регионах мира. Повреждение, наносимое насекомыми-вредителями, является основным фактором потери культур кукурузы в мире, несмотря на применение мер защиты, таких как химические пестициды. С учетом этого в культуры, такие как кукуруза, методами генной инженерии встраивали устойчивость к насекомым для контроля повреждения, вызываемого насекомыми, и снижения потребности в традиционных химических пестицидах. Одной из групп генов, используемых для получения трансгенных культур, устойчивых к насекомым, является группа дельта-эндотоксина из *Bacillus thuringiensis* (Bt). Дельта-эндотоксины успешно экспрессируются в культурных растениях, таких как хлопчатник, картофель, рис, подсолнечник, а также кукуруза, и было доказано, что они обеспечивают эффективный контроль над насекомыми-вредителями (Perlak, F.J. et al. (1990 г.) *Bio/Technology* 8:939-943; Perlak, F.J. et al. (1993 г.) *Plant Mol. Biol.* 22:313-321; Fujimoto, H. et al. (1993 г.) *Bio/Technology* 11:1151-1155; Tu et al. (2000 г.) *Nature Biotechnology* 18:1101-1104; международная публикация WO 01/13731; и Bing, J.W. et al. (2000 г.) *Efficacy of Cry1F Transgenic Maize*, 14th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop, г. Форт-Коллинс, штат Колорадо, США).

Известно, что на экспрессию чужеродных генов в растениях влияет их местоположение в геноме растения, что, вероятно, является следствием структуры хроматина (например, гетерохроматина) или близостью регуляторных элементов транскрипции (например, энхансеров) к сайту интеграции (Weising et al. (1988 г.) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477). В то же время наличие трансгена в разных местоположениях генома будет по-разному влиять на общий фенотип растения. По этой причине зачастую необходимо проводить скрининг большого числа объектов, чтобы идентифицировать объект, характеризующийся оптимальной экспрессией представляющего интерес введенного гена. Например, по данным наблюдений, у растений и других организмов может быть широкий спектр уровней экспрессии введенного гена среди объектов. Также могут быть различия в пространственном или временном профилях экспрессии, например различия в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растения, которые могут не соответствовать профилям, ожидаемым от регуляторных элементов транскрипции, присутствующих во введенном генном конструкте. По этой причине распространенной практикой является создание от сотен до тысяч различных объектов и проведение скрининга этих объектов для идентификации одного объекта, который имеет требуемые для коммерческих целей уровни и профили экспрессии. Объект, имеющий требуемые уровни или профили экспрессии трансгена, подходит для внедрения трансгена в другие генетические окружения путем полового скрещивания с применением традиционных способов разведения. Потомство от такого скрещивания поддерживает характеристики экспрессии трансгена первоначального трансформанта. Данную стратегию применяют для обеспечения надежной экспрессии гена в ряде сортов, хорошо адаптированных к локальным условиям выращивания.

Было бы преимущественно иметь возможность обнаружить наличие конкретного объекта, чтобы определить, содержится ли представляющий интерес трансген в потомстве от полового скрещивания. Кроме того, способ обнаружения конкретного объекта был бы полезен, например, для соблюдения нормативных положений, требующих предпродажного утверждения и маркировки пищевых продуктов, полученных из рекомбинантных культурных растений, или для применения экологического мониторинга, мониторинга признаков в культурах в поле или мониторинга продукции, полученной при сборе культу-

ры, а также для применения при обеспечении соблюдения требований сторонами, которые должны соблюдать нормативы или положения контракта.

Возможно обнаруживать наличие трансгена любым способом обнаружения нуклеиновых кислот, известным специалистам в данной области, включая, без ограничений, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или гибридизацию ДНК с применением нуклеотидных зондов. Данные способы обнаружения по существу ориентированы на часто применяемые генетические элементы, такие как промоторы, терминаторы, маркерные гены и т.п., поскольку для многих ДНК-конструктов кодирующая область является взаимозаменяемой. В результате этого такие способы могут быть бесполезны для различения разных объектов, в особенности тех, которые были получены с применением того же ДНК-конструкта или очень похожих конструктов, если неизвестна последовательность фланкирующей ДНК, смежная со вставленной гетерологичной ДНК. Например, в патенте США № 6395485 описан специфичный для объекта ПЦР-анализ для обнаружения элитного объекта GAT-ZM1. Соответственно, было бы желательно иметь простой и характерный способ идентификации объекта DP-004114-3.

Краткое описание изобретения

Варианты осуществления данного изобретения относятся к способам получения и селекции устойчивого к насекомым однодольного культурного растения. Более конкретно, предложен ДНК-конструкт, который при экспрессии в растительных клетках и растениях придает устойчивость к насекомым. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предложен ДНК-конструкт, который можно ввести и с помощью которого можно провести репликацию в клетке-хозяине, экспрессия которого в растительных клетках и растениях придает растительным клеткам и растениям устойчивость к насекомым. Объект маиса DP-004114-3 получали путем опосредованной *Agrobacterium* трансформации плазмидой PHP27118. Данный объект содержит генные кассеты *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* и *pat*, придающие устойчивость к определенным вредителям из отрядов чешуекрылые и жесткокрылые, а также устойчивость к фосфинотрицину.

В частности, первая кассета содержит укороченную версию гена *cry1F* из *Bacillus thuringiensis*, var. *aizawai*. Вставка гена *cry1F* придает устойчивость к повреждению вредителями из отряда чешуекрылые. Белок *Cry1F* (SEQ ID NO: 1) образован из 605 аминокислот и имеет молекулярный вес приблизительно 68 кДа. Управление экспрессией гена *cry1F* осуществляется промотором полиубиквитина маиса (Christensen et al. (1992 г.) *Plant Mol. Biol.* 118(4):675-89), обеспечивающим конститутивную экспрессию белка *Cry1F* в маисе. Данная область также включает 5'-нетранслируемую область (UTR) и интрон, связанный с нативным промотором полиубиквитина. Терминатором для гена *cry1F* является сигнал добавления *poly(A)* из открытой рамки считывания 25 (ORF 25) Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* pTi15955 (Barker et al. (1983 г.) *Plant Mol. Biol.* 2:335-350).

Вторая кассета содержит ген *cry34Ab1*, выделенный из *Bacillus thuringiensis*, штамм PS149B1 (патенты США №№ 6127180; 6624145 и 6340593). Белок *Cry34Ab1* (SEQ ID NO: 2) имеет длину 123 аминокислотных остатка и молекулярный вес приблизительно 14 кДа. Управление экспрессией гена *cry34Ab1* осуществляется второй копией промотора полиубиквитина маиса 5'-UTR и интроном (Christensen et al., 1992 г., выше). Терминатором для гена *cry34Ab1* является терминатор *pinII* (Keil et al. (1986 г.) *Nucleic Acids Res.* 14:5641-5650; An et al. (1989 г.) *Plant Cell* 1:115-22).

Третья генная кассета содержит ген *cry35Ab1*, также выделенный из *Bacillus thuringiensis*, штамм PS149B1 (патенты США №№ 6083499; 6548291 и 6340593). Белок *Cry35Ab1* (SEQ ID NO: 3) имеет длину 383 аминокислоты и молекулярный вес приблизительно 44 кДа. Одновременная экспрессия белков *Cry34Ab1* и *Cry35Ab1* в растении придает устойчивость к жесткокрылым насекомым. Управление экспрессией гена *cry35Ab1* осуществляется промотором пероксидазы *Triticum aestivum* (пшеница) и лидерной последовательностью (Hertig et al. (1991 г.) *Plant Mol. Biol.* 16:171-174). Терминатором для гена *cry35Ab1* является вторая копия терминатора *pinII* (Keil et al., 1986 г., выше; An et al., 1989 г., выше).

Четвертая и последняя генная кассета содержит версию гена фосфинотрицинацетилтрансферазы из *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*), оптимизированного для экспрессии в маисе. Ген *pat* экспрессирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу (ПАТ), придающий устойчивость к фосфинотрицину. Белок ПАТ (SEQ ID NO: 4) имеет длину 183 аминокислотных остатка и молекулярный вес приблизительно 21 кДа. Управление экспрессией гена *pat* осуществляется промоторной и терминаторной областями из транскрипта CaMV 35S (Franck et al. (1980 г.) *Cell* 21:285-294; Odell et al. (1985 г.) *Nature* 313:810-812; Pietrzak, et al. (1986 г.) *Nucleic Acids Res.* 14(14):5857-5868). Также предложены растения, содержащие ДНК-конструкты.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предложены композиции и способы идентификации нового растения кукурузы, обозначенного DP-004114-3. Способы основаны на праймерах или зондах, специфически распознающих 5'- и/или 3'-фланкирующие последовательности DP-004114-3. Предложены молекулы ДНК, содержащие праймерные последовательности, которые при использовании в ПЦР-реакции позволяют получить ампликоны, уникальные для трансгенного объекта DP-004114-3. Растение кукурузы и семя, содержащие данные молекулы, являются вариантом осуществления данного изобретения. Дополнительно предложены наборы, в которых используются данные праймерные последовательности для идентификации объекта DP-004114-3.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к специфической фланкирующей последовательности DP-004114-3, описанной в настоящем документе, которую можно применять для разработки специфических способов идентификации для DP-004114-3 в биологических образцах. Более конкретно, настоящее изобретение относится к 5'- и/или 3'-фланкирующим областям DP-004114-3, которые могут применяться для разработки специфических праймеров и зондов. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способам идентификации наличия DP-004114-3 в биологических образцах на основе применения таких специфических праймеров или зондов.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предложены способы обнаружения наличия в образце ДНК, соответствующей объекту кукурузы DP-004114-3. Такие способы включают: (a) приведение образца, содержащего ДНК, в контакт с набором праймеров ДНК так, чтобы при применении реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК, экстрагированной из объекта кукурузы DP-004114-3, получали ампликон, позволяющий определить объект кукурузы DP-004114-3; (b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, посредством которой получают ампликон; и (c) обнаружение ампликона.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предложены способы обнаружения наличия в образце молекулы ДНК, соответствующей объекту DP-004114-3, причем такие способы включают: (a) приведение образца, содержащего ДНК, экстрагированную из растения кукурузы, в контакт с молекулой ДНК зонда, которая в строгих условиях гибридизации гибридизируется с ДНК, экстрагированной из объекта кукурузы DP-004114-3, и в строгих условиях гибридизации не гибридизируется с ДНК контрольного растения кукурузы; (b) воздействие на образец и зонд строгих условий гибридизации; и (c) обнаружение гибридизации зонда с ДНК. Более конкретно, предложен способ обнаружения наличия молекулы ДНК, соответствующей объекту DP-004114-3 в образце, причем способы состоят из (a) приведения образца, содержащего ДНК, экстрагированную из растения кукурузы, в контакт с молекулой ДНК зонда, состоящей из последовательностей, уникальных для объекта, например соединительных последовательностей, причем указанная молекула ДНК зонда гибридизируется в строгих условиях гибридизации с ДНК, экстрагированной из объекта кукурузы DP-004114-3, и не гибридизируется в строгих условиях гибридизации с ДНК контрольного растения кукурузы; (b) воздействие на образец и зонд строгих условий гибридизации и (c) обнаружение гибридизации зонда с ДНК.

Кроме того, предложены набор и способы идентификации объекта DP-004114-3 в биологическом образце, которые обнаруживают специфичную для DP-004114-3 область.

Предложены молекулы ДНК, содержащие по меньшей мере одну соединительную последовательность DP-004114-3; причем соединительная последовательность охватывает область соединения между гетерологичной ДНК, вставленной в геном, и ДНК из клетки кукурузы, фланкирующую сайт вставки, т.е. фланкирующую ДНК, и позволяет определить объект DP-004114-3.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предложены способы получения растения кукурузы, устойчивого к насекомым, которые включают следующие этапы: (a) половое скрещивание первой родительской линии кукурузы, содержащей экспрессионные кассеты настоящего изобретения, которые придают устойчивость к насекомым, и второй родительской линии кукурузы, не имеющей устойчивости к насекомым, посредством чего получая множество растений-потомков; и (b) селекцию растения-потомка, являющегося устойчивым к насекомым. Такие способы могут необязательно включать дополнительный этап возвратного скрещивания растения-потомка со второй родительской линией кукурузы с получением чистого растения кукурузы, устойчивого к насекомым.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения растения кукурузы, устойчивого к насекомым, включающий трансформацию клетки кукурузы ДНК-конструктом RNP27118, выращивание трансформированной клетки кукурузы в растении кукурузы, селекцию растения кукурузы, демонстрирующего устойчивость к насекомым, и дополнительное выращивание растения кукурузы с получением растения кукурузы с репродуктивной функцией. Растение кукурузы с репродуктивной функцией можно подвергнуть самоопылению или скрещиванию с совместимыми сортами кукурузы с получением устойчивого к насекомым потомства.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения дополнительно относится к набору для обнаружения ДНК для идентификации объекта маиса DP-004114-3 в биологических образцах. Набор содержит первый праймер, специфически распознающий 5'- или 3'-фланкирующую область DP-004114-3, и второй праймер, специфически распознающий последовательность внутри экзогенной ДНК DP-004114-3 или внутри фланкирующей ДНК для применения в протоколе идентификации с помощью ПЦР. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору для идентификации объекта DP-004114-3 в биологических образцах, причем набор содержит специфичный зонд, имеющий последовательность, которая соответствует или комплементарна последовательности, имеющей 80-100% идентичность последовательности со специфичной областью объекта DP-004114-3. Последовательность зонда соответствует специфичной области, содержащей часть 5'- или 3'-фланкирующей области объекта DP-004114-3.

Способы и наборы, охватываемые вариантами осуществления настоящего изобретения, можно применять для различных целей, таких как, без ограничений, следующие: для идентификации объекта

DP-004114-3 в растениях, растительном материале или продуктах, таких как, без ограничений, пищевые или кормовые продукты (свежие или переработанные), содержащие растительный материал или полученные из растительного материала; дополнительно или альтернативно, способы и наборы могут применяться для идентификации материала трансгенного растения для целей сегрегации трансгенного и не-трансгенного материала; дополнительно или альтернативно способы и наборы могут применяться для определения качества растительного материала, содержащего объект маиса DP-004114-3. Наборы также могут содержать реагенты и материалы, необходимые для выполнения способа обнаружения.

Дополнительный вариант осуществления данного изобретения относится к растению кукурузы DP-004114-3 или его частям, включая, без ограничений, пыльцу, семязачатки, вегетативные клетки, ядра пыльцевых клеток или ядра яйцеклеток растения кукурузы DP-004114-3 и полученного от него потомства. Растение кукурузы и семена DP-004114-3, в которых молекулы ДНК-праймера обеспечивают специфичный продукт-ампликон, являются вариантом осуществления настоящего изобретения.

Представленные выше и другие аспекты настоящего изобретения станут более понятны из представленного ниже подробного описания и приложенных чертежей.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - принципиальная схема плазмиды RHP27118 с указанными генетическими элементами и сайтами рестрикционного фермента Hind III. Размер плазмиды составляет 54910 п.о.

Фиг. 2 - принципиальная схема Т-ДНК с указанными генами *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* и *pat* (стрелки) и соответствующими им регуляторными элементами. Указаны сайты рестрикционного фермента Hind III внутри Т-ДНК. Размер Т-ДНК составляет 11978 п.о.

Фиг. 3 - принципиальная схема трансформации и развития DP-004114-3.

Фиг. 4 - воздействие на развитие личинок западного кукурузного жука (WCRW), оцениваемое в рамках сублетального анализа с проростками гибридного маиса с таким же генетическим окружением: маис DP-004114-3 и изолиния в качестве отрицательного контроля. Результаты основаны на трех повторностях. На графических профилях показана процентная доля личинок в каждой из трех личиночных стадий через 17 дней после выведения из яиц. Смещение в сторону личиночной стадии 3 указывает на снижение эффективности.

Фиг. 5 - схематическое представление вставки и пограничных геномных областей, секвенированных в маисе 4114. На схеме указаны ПЦР-фрагменты, полученные из геномной ДНК маиса 4114, которые были клонированы и секвенированы: фрагменты с А по F. Вертикальной пунктирной линией представлены места соединения пограничной области/вставки в геноме. Фрагменты G и H представляют собой 5'- и 3'-пограничные геномные области соответственно. Фигура изображена без соблюдения масштаба.

Подробное описание изобретения

Представленные ниже определения и способы предложены для лучшего определения настоящего изобретения и для предоставления указаний по практической реализации настоящего изобретения для обычных специалистов в данной области. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии с традиционным применением среди обычных специалистов в соответствующей области. Определения распространенных терминов молекулярной биологии также можно найти в публикациях Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5 изд., Springer-Verlag; г. Нью-Йорк, 1991 г.; и Lewin, Genes V, Oxford University Press; г. Нью-Йорк, 1994 г. Применяется номенклатура оснований ДНК, представленная в 37 CFR §1.822.

В представленной ниже таблице приведены сокращения, применяемые в тексте данного документа и, в частности, в разделе "Примеры".

Таблица сокращений

Маис 4114	Маис, содержащий объект DP-004114-3
п.о.	Пар оснований
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	Вирус мозаики цветной капусты
<i>cry1F</i>	Ген <i>cry1F</i> из <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>
Cry1F	Белок гена <i>cry1F</i>
<i>cry34Ab1</i>	Ген <i>cry34Ab1</i> из <i>Bacillus thuringiensis</i> , штамм PS149B1
Cry34Ab1	Белок гена <i>cry34Ab1</i>
<i>cry35Ab1</i>	Ген <i>cry35Ab1</i> из <i>Bacillus thuringiensis</i> , штамм PS149B1
Cry35Ab1	Белок гена <i>cry35Ab1</i>
Т.п.о.	Тысяч пар оснований
кДа	Килодальтон
ЛГ	Левая граница Т-ДНК
<i>pat</i>	Ген фосфинотрицинацетилтрансферазы
PAT	Белок гена фосфинотрицинацетилтрансферазы
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

pinII	Ген ингибитора протеиназы II из <i>Solanum tuberosum</i>
ПГ	Правая граница Т-ДНК
Т-ДНК	Часть ДНК для переноса трансформационной плазмиды <i>Agrobacterium</i> между левой и правой границами, которая, как и ожидалось, переносится в геном растения
UTR	Нетранслируемая область
ECB	Мотылек кукурузный (<i>Ostrinia nubilalis</i>)
FAW	Совка травяная (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
WCRW	Западный кукурузный жук (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)

Композиции данного описания включают семена, внесенные в патентный реестр под № РТА-11506, а также растения, растительные клетки и семена, полученные из них. Заявитель(и) депонировал(и) по меньшей мере 2500 семян объекта маиса DP-004114-3 в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния 20110-2209 США, 24 ноября 2010 г., и депозитам был присвоен номер депозита ATCC РТА-11506. Данные депозиты будут храниться в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Данные депозиты были сделаны только для удобства специалистов в данной области, а не в качестве признания того, что депозит является обязательным в соответствии со статьей 35 Свода законов США §112. Семена, депонированные в ATCC 24 ноября 2010 г., были сняты с депозита, хранимого Pioneer Hi-Bred International, Inc., 7250 NW 62nd Avenue, г. Джонстон, штат Айова, 50131-1000. Доступ к данному депозиту во время рассмотрения заявки будет по запросу предоставлен комиссару Ведомства по патентам и товарным знакам и лицам, которые были определены комиссаром как уполномоченные на это. При получении решения о патентоспособности каких-либо пунктов формулы изобретения в заявке заявитель(и) в соответствии со статьей 37 C.F.R. § 1.808 обеспечит(ат) публичный доступ к образцу(ам) депозита по меньшей мере из 2500 семян гибридного маиса в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, г. Манассас, штат Вирджиния, 20110-2209. Данный депозит семян объекта маиса DP-004114-3 будет храниться в депозитарии ATCC, который является публичным депозитарием, в течение 30-летнего периода, или в течение 5 лет после самого последнего запроса, или в течение установленного срока действия патента в зависимости от того, какой срок больше, и будет заменен, если в течение этого периода станет нежизнеспособным. Кроме того, заявитель(и) выполнил(и) все требования статьи 37 C.F.R. §§1.801-1.809, включая обеспечение указания на жизнеспособность образца при депонировании. Заявитель(и) не имеет(ют) права отступать от каких-либо ограничений, налагаемых законом на передачу биологического материала или его коммерческую транспортировку. Заявитель(и) не отказывается(ются) от любых нарушений их прав, гарантированных в соответствии с данным патентом или правами, применимыми к объекту DP-004114-3 в рамках Закона об охране сорта растений (7 USC 2321 и далее). Запрещено несанкционированное размножение семян. Семена могут подлежать регулированию.

В настоящем документе термин "содержащий" означает "включая, без ограничений".

В настоящем документе термин "кукуруза" означает *Zea mays*, или маис, и включает все сорта растения, которые можно вывести с кукурузой, включая дикие виды маиса.

В настоящем документе термин "специфичный для DP-004114-3" означает нуклеотидную последовательность, подходящую для различительной идентификации объекта DP-004114-3 в растениях, растительном материале или в продуктах, таких как, без ограничений, пищевые или кормовые продукты (свежие или переработанные), содержащие или полученные из растительного материала.

В настоящем документе термины "устойчивый к насекомым" и "воздействующий на насекомых-вредителей" означает внесение изменений в поедание, рост и/или поведение насекомых на любой стадии развития, включая, без ограничений: умерщвление насекомого; замедление роста; нарушение репродуктивной способности; подавление поедания и т.п.

В настоящем документе термины "пестицидная активность" и "инсектицидная активность" применяются как синонимы, означающие активность организма или вещества (такого как, например, белок), которую можно измерить по множеству параметров, включая, без ограничений, смертность вредителей, потерю веса у вредителей, привлечение вредителей, отталкивание вредителей и другие поведенческие и физические изменения у вредителей после поедания и/или воздействия организма или вещества в течение соответствующего отрезка времени. Например, "пестицидные белки" - это белки, проявляющие пестицидную активность сами по себе или в комбинации с другими белками.

Термин "кодирующая последовательность" означает нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретную аминокислотную последовательность. В настоящем документе термины "кодирующий" или "закодированный", применяемый в контексте установленной нуклеиновой кислоты, означает, что нуклеиновая кислота содержит информацию, необходимую для направления трансляции нуклеотидной последовательности в установленный белок. Информация, с помощью которой кодируется белок, указывается путем применения кодонов. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок, может содержать нетранслируемые последовательности (например, интроны) внутри транслируемых областей нуклеиновой кислоты или же может не содержать такие неустановившиеся нетранслируемые последовательности (на-

пример, как в кДНК).

Термин "ген" означает фрагмент нуклеиновой кислоты, экспрессирующий специфичный белок, включая регуляторные последовательности, которые предшествуют (5'-некодирующие последовательности) или следуют (3'-некодирующие последовательности) за кодирующей последовательностью. Термин "нативный ген" означает ген в той форме, в которой он встречается в природе, со своими собственными регуляторными последовательностями. Термин "химерный ген" означает любой ген, не являющийся нативным геном, содержащий регуляторные и кодирующие последовательности, которые вместе в природе не встречаются. Соответственно, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из того же источника, но расположенные способом, отличным от того, как они встречаются в природе. Термин "эндогенный ген" означает нативный ген в своем естественном местоположении в геноме организма. Термин "чужеродный" означает материал, в обычных условиях не находящийся в представляющем интерес местоположении. Таким образом, "экзогенная ДНК" может содержать как рекомбинантную ДНК, так и новую введенную перестроенную ДНК растения. "Чужеродный" ген означает ген, в обычных условиях не встречающийся в организме-хозяине, но введенный в организм-хозяин путем переноса гена. Чужеродные гены могут содержать нативные гены, вставленные в ненативный организм, или химерные гены. Термин "трансген" означает ген, введенный в геном с помощью процедуры трансформации. Сайт в геноме растения, в который была введена рекомбинантная ДНК, может обозначаться как "сайт вставки" или "сайт-мишень".

В настоящем документе "ДНК вставки" означает гетерологичную ДНК внутри экспрессионных каскадов, применяемых для трансформации растительного материала, тогда как "фланкирующая ДНК" может существовать либо в геномной ДНК, в естественных условиях присутствующей в организме, таком как растение, либо в экзогенной (гетерологичной) ДНК, введенной с помощью процесса трансформации, внешней относительно первоначальной молекулы ДНК вставки, например фрагменты, связанные с объектом трансформации. В настоящем документе "фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность" означает последовательность по меньшей мере из 20 п.о., предпочтительно по меньшей мере 50 п.о. и до 5000 п.о., которая размещена либо непосредственно до и смежно с, либо непосредственно после и смежно с первоначальной экзогенной молекулой ДНК вставки. Процедуры трансформации, которые приводят к случайной интеграции экзогенной ДНК, позволят получить трансформанты, содержащие различные фланкирующие области, характерные и уникальные для каждого трансформанта. При введении рекомбинантной ДНК в растение с помощью традиционного скрещивания ее фланкирующие области, по существу, не изменятся. Трансформанты также будут содержать уникальные соединения между частью гетерологичной ДНК вставки и геномной ДНК, или двумя частями геномной ДНК, или двумя частями гетерологичной ДНК. "Соединение" представляет собой точку, в которой соединяются два специфичных фрагмента ДНК. Например, соединение существует там, где ДНК вставки соединяется с фланкирующей ДНК. Точка соединения также существует в трансформированном организме, в котором два фрагмента ДНК соединяются вместе таким образом, что они являются модифицированными относительно присутствующей в нативном организме. Термин "соединительная ДНК" означает ДНК, содержащую точку соединения. Две соединительные последовательности, представленные в данном описании, представляют собой точку соединения между геномной ДНК маиса и 5'-концом вставки, как представлено в SEQ ID NO: 27, а также точку соединения между 3'-концом вставки и геномной ДНК маиса, как представлено в SEQ ID NO: 28.

В настоящем документе термин "гетерологичный" в отношении нуклеиновой кислоты означает нуклеиновую кислоту, полученную из чужеродных видов, или, если она получена от тех же видов, по существу, подвергнутую модификации относительно ее нативной формы в композиции и/или в локусе генома в результате целенаправленного вмешательства человека. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, может быть получен от видов, отличных от тех, из которых была получена нуклеотидная последовательность, или, если промотор был получен от тех же видов, в естественных условиях, он может быть функционально не связан с нуклеотидной последовательностью. Гетерологичный белок может быть получен от чужеродных видов или, если он получен от тех же видов, то он, по существу, модифицирован относительно его первоначальной формы путем целенаправленного вмешательства человека.

Термин "регуляторные последовательности" означает нуклеотидные последовательности, размещенные до (5'-некодирующие последовательности), внутри или после (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию связанной кодирующей последовательности. К регуляторным последовательностям могут относиться промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны и последовательности обнаружения полиаденилирования.

Термин "промотор" означает нуклеотидную последовательность, которая может управлять экспрессией кодирующей последовательности или функциональной РНК. Как правило, кодирующая последовательность размещена на 3'-конце относительно промоторной последовательности. Промоторная последовательность состоит из проксимальных и более дистальных расположенных выше элементов, причем

последние элементы зачастую называют энхансерами. Соответственно, "энхансер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может стимулировать активность промотора и может представлять собой внутренний элемент промотора или гетерологичный элемент, вставленный для усиления уровня или тканеспецифичности промотора. Промоторы могут быть полностью получены из нативного гена или могут состоять из разных элементов, полученных из разных промоторов, встречающихся в естественных условиях, или даже могут содержать синтетические нуклеотидные сегменты. Специалистам в данной области понятно, что разные промоторы могут направлять экспрессию гена в разных тканях или типах клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на разные условия окружающей среды. Промоторы, которые вызывают экспрессию фрагмента нуклеиновой кислоты в большинстве типов клеток большую часть времени, как правило, называют "конститутивными промоторами". Постоянно открывают новые промоторы различных типов, которые могут применяться в растительных клетках; множество примеров можно найти в обзоре Okamoto and Goldberg (1989 г.) *Biochemistry of Plants* 15:1-82. Дополнительно следует понимать, что поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей полностью не определены, фрагменты нуклеиновых кислот разной длины могут иметь идентичную промоторную активность.

Термин "трансляционная лидерная последовательность" означает нуклеотидную последовательность, размещенную между промоторной последовательностью гена и кодирующей последовательностью. Трансляционная лидерная последовательность присутствует в прошедшей полной процессинг мРНК перед последовательностью запуска трансляции. Трансляционная лидерная последовательность может влиять на множество параметров, включая процессинг первичного транскрипта в мРНК, стабильность мРНК и/или эффективность трансляции. Описаны примеры трансляционных лидерных последовательностей (Turner and Foster (1995 г.) *Mol. Biotechnol.* 3:225-236).

Термин "3'-некодирующие последовательности" означает нуклеотидные последовательности, размещенные после кодирующей последовательности, и включает последовательности распознавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию гена. Как правило, сигнал полиаденилирования характеризуется путем влияния на добавление участков полиадениловой кислоты к 3'-концу предшественника мРНК. Примеры разных 3'-некодирующих последовательностей представлены в публикации Ingelbrecht et al. (1989 г.) *Plant. Cell.* 1:671-680.

Термин "белок" или "полипептид" представляет собой цепь аминокислот, расположенных в конкретном порядке, определяемом кодирующей последовательностью в полинуклеотиде, который кодирует полипептид.

ДНК-конструкт представляет собой сборку из молекул ДНК, связанных вместе с обеспечением одной или более экспрессионных кассет. ДНК-конструкт может представлять собой плазмиду, способную к саморепликации в бактериальной клетке и содержащую различные сайты рестрикции для эндонуклеазного фермента, которые могут применяться для введения молекул ДНК, обеспечивающих функциональные генетические элементы, т.е., помимо прочего, промоторы, интроны, лидеры, кодирующие последовательности, 3'-терминирующие области; или ДНК-конструкт может представлять собой линейную сборку из молекул ДНК, такую как экспрессионная кассета. Экспрессионная кассета, содержащаяся внутри ДНК-конструкта, содержит генетические элементы, необходимые для обеспечения транскрипции матричной РНК. Экспрессионная кассета может быть выполнена с возможностью экспрессии в прокариотических клетках или эукариотических клетках. Экспрессионные кассеты вариантов осуществления настоящего изобретения выполнены с возможностью экспрессии в растительных клетках.

Молекулы ДНК вариантов осуществления настоящего изобретения предложены в экспрессионных кассетах для экспрессии в представляющем интерес организме. Кассета включает 5'- и 3'-регуляторные последовательности, функционально связанные с кодирующей последовательностью. Термин "функционально связанный" означает, что связываемые нуклеотидные последовательности являются смежными, а также, если это необходимо для соединения двух кодирующих белок областей, являются смежными и находятся в той же рамке считывания. Предполагается, что термин "функционально связанный" указывает на функциональную связь между промотором и второй последовательностью, причем промоторная последовательность инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, который проходит одновременную трансформацию в организме. Альтернативно дополнительный(е) ген(ы) может(могут) быть предусмотрены на множестве экспрессионных кассет или на множестве ДНК-конструктов.

Экспрессионная кассета будет включать в направлении транскрипции от 5'- к 3'-концу: область, инициирующую транскрипцию и трансляцию, кодирующую область и область терминации транскрипции и трансляции, которые функциональны в организме, служащем в качестве хозяина. Область инициации транскрипции (т.е. промотор) может быть нативной, или аналогичной, или экзогенной, или гетерологичной для организма-хозяина. Кроме того, промотор может быть естественной последовательностью или альтернативно синтетической последовательностью. Экспрессионные кассеты могут дополнительно содержать 5'-лидерные последовательности в конструкте экспрессионной кассеты. Такие лидерные по-

следовательности могут действовать с усилением трансляции.

Следует понимать, что в настоящем документе термин "трансгенный" включает любую клетку, клеточную линию, каллус, ткань, часть растения или растение, генотип которого был изменен путем наличия гетерологичной нуклеиновой кислоты, включая те из них, которые исходно были изменены таким образом, а также те, которые были созданы путем половых скрещиваний или неполового размножения из исходных трансгенных форм. В настоящем документе термин "трансгенный" не охватывает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) традиционными способами разведения растения или с помощью событий, встречающихся в естественных условиях, таких как случайное перекрестное оплодотворение, нерекомбинантная вирусная инфекция, нерекомбинантная бактериальная трансформация, нерекомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

Трансгенный "объект", полученный путем трансформации растительных клеток гетерологичным(и) ДНК-конструктом(ами), включая экспрессионную кассету с нуклеиновыми кислотами, содержащую представляющий интерес трансген, регенерации популяции растений, полученных в результате вставки трансгена в геном растения, а также селекции конкретного растения, характеризующегося вставкой в конкретное местоположение генома. Объект фенотипически характеризуется экспрессией трансгена. На генетическом уровне объект является частью набора генов растения. Термин "объект" также означает потомство, полученное путем полового скрещивания между трансформантом и другим сортом, включающим гетерологичную ДНК. Даже после повторных возвратных скрещиваний с рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК от трансформированного родителя присутствуют в потомстве от скрещивания в том же местоположении на хромосоме. Термин "объект" также означает ДНК от первоначального трансформанта, содержащего вставленную ДНК и фланкирующую последовательность, непосредственно смежную со вставленной ДНК, которая, как ожидается, будет передаваться потомству, получающему вставленную ДНК, включая представляющий интерес трансген, в результате полового скрещивания одной родительской линии, которая включает вставленную ДНК (например, первоначального трансформанта и его потомства, полученного от самоопыления), и родительской линии, не содержащей вставленной ДНК.

Устойчивое к насекомым растение кукурузы DP-004114-3 можно вывести путем первого полового скрещивания первого родительского растения кукурузы, представляющее собой растение кукурузы, выращенное из трансгенного растения кукурузы DP-004114-3 или его потомства, полученного в результате трансформации экспрессионными кассетами вариантов осуществления настоящего изобретения, которые придадут устойчивость к насекомым, и второго родительского растения кукурузы, не имеющего устойчивости к насекомым, посредством чего получая множество первых растений-потомков; и затем отбора первого растения-потомка, устойчивого к насекомым; самоопыления первого растения-потомка, посредством чего получая множество вторых растений-потомков; и затем выбора из вторых растений-потомков растения, устойчивого к насекомым. Данные этапы дополнительно могут включать возвратное скрещивание первого устойчивого к насекомым растения-потомка или второго устойчивого к насекомым растения-потомка со вторым родительским растением кукурузы или третьим родительским растением кукурузы, посредством чего получая растение кукурузы, устойчивое к насекомым.

В настоящем документе термин "растение" включает обозначение целых растений, органов растений (например, листьев, стеблей, корней и т.д.), семян, растительных клеток и их потомства. Части трансгенных растений, которые считаются находящимися в рамках объема настоящего изобретения, содержат, например, растительные клетки, протопласты, ткани, каллус, зародыши, а также цветы, стебли, плоды, листья и корни, происходящие от трансгенных растений или их потомства, ранее трансформированных молекулой ДНК настоящего изобретения, и поэтому состоящие по меньшей мере из части трансгенных клеток, также являющиеся вариантом осуществления настоящего изобретения.

В настоящем документе термин "растительная клетка" включает, без ограничений, семена, культуры суспензий, зародыши, меристематические области, ткань каллуса, листья, корни, побеги, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры. Класс растений, которые можно применять в способах настоящего изобретения, по существу, охватывает весь класс высших растений, пригодных для техник трансформации, включая как однодольные, так и двудольные растения.

Термин "трансформация" означает перенос фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Организмы-хозяева, содержащие трансформированные фрагменты нуклеиновой кислоты, также называют "трансгенными" организмами. Примеры способов трансформации растения включают трансформацию, опосредованную *Agrobacterium* (De Blaere et al. (1987 г.) *Meth. Enzymol.* 143:277), и технологию трансформации с применением ускоренных частиц или "генной пушки" (Klein et al. (1987 г.) *Nature* (г. Лондон) 327:70-73; патент США № 4945050, включенный в настоящий документ путем ссылки). Ниже описаны дополнительные способы трансформации.

Таким образом, выделенные полинуклеотиды настоящего изобретения могут быть встроены в рекомбинантные конструкции, как правило, ДНК-конструкции, которые могут быть введены в и могут реплицироваться в клетке-хозяине. Такой конструкт может представлять собой вектор, включающий систему репликации и последовательности, имеющие способность к транскрипции и трансляции кодирующей

полипептид последовательности в заданной клетке-хозяине. Ряд векторов, подходящих для стабильной трансфекции растительных клеток или для создания трансгенных растений, был описан, например, в публикациях Pouwels et al., (1985 г.; доп.1987 г.) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Weissbach and Weissbach (1989 г.) *Methods for Plant Molecular Biology*, (Academic Press, г. Нью-Йорк); и Flevin et al., (1990 г.) *Plant Molecular Biology Manual*, (Kluwer Academic Publishers). Как правило, векторы экспрессии растения включают, например, один или более клонированных генов растения под контролем транскрипции 5'- и 3'-концевых регуляторных последовательностей и доминантного селектируемого маркера. Такие векторы экспрессии растения также могут содержать промоторную регуляторную область (например, регуляторную область, управляющую индуцибельной или конститутивной, зависящей от окружающей среды или стадии развития, или клеточно- или тканеспецифичной экспрессией), сайт начала инициации транскрипции, сайт связывания рибосомы, сигнал РНК-процессинга, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Также следует понимать, что два разных трансгенных растения также можно спаривать с получением потомка, содержащего два независимо сегрегируемых добавленных экзогенных гена. В результате самоопыления соответствующего потомства могут быть получены растения, гомозиготные по обоим добавленным экзогенным генам. Также предусмотрены возвратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением, а также вегетативное размножение. Описания других способов разведения, часто применяемых для разных признаков и культур, можно найти в одном из нескольких источников, например в публикации Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development*, под ред. Wilcos J., American Society of Agronomy, г. Мэдисон, штат Висконсин (1987 г.).

"Зонд" представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, к которой присоединена традиционная обнаруживаемая метка или репортерная молекула, например радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент. Такой зонд комплементарен цепи целевой нуклеиновой кислоты, а в случае настоящего изобретения - цепи выделенной ДНК из объекта кукурузы DP-004114-3, полученной из растения кукурузы или из образца, включающего ДНК из объекта. Зонды, соответствующие настоящему изобретению, включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также полиамиды и другие материалы зонда, специфически связывающиеся с целевой последовательностью ДНК и которые могут применяться для обнаружения наличия целевой последовательности ДНК.

"Праймеры" представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют с комплементарной цепью целевой ДНК путем гибридизации нуклеиновой кислоты с образованием гибрида между праймером и цепью целевой ДНК, а затем элонгацией вдоль цепи целевой ДНК с помощью полимеразы, например ДНК-полимеразы. Пары праймеров настоящего изобретения относятся к их применению для амплификации целевой нуклеотидной последовательности, например, путем ПЦР или других традиционных способов амплификации нуклеиновых кислот. "ПЦР" или "полимеразная цепная реакция" представляет собой технику, применяемую для амплификации специфичных сегментов ДНК (см. патенты США №№ 4683195 и 4800159; включенные в настоящий документ путем ссылки).

Зонды и праймеры имеют достаточную длину из нуклеотидов, чтобы специфически связываться с целевой последовательностью ДНК в условиях гибридизации или в условиях реакции, определяемых оператором. Данная длина может быть любой длиной, достаточной для применения в выбранном методе обнаружения. По существу, применяют длину из 11 нуклеотидов или более, 18 нуклеотидов или более и 22 нуклеотидов или более. Такие зонды и праймеры специфически гибридизируются с целевой последовательностью в условиях гибридизации высокой строгости. Зонды и праймеры в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут иметь полное сходство последовательности ДНК смежных нуклеотидов с целевой последовательностью, хотя с помощью традиционных способов могут быть разработаны зонды, отличные от целевой последовательности ДНК и сохраняющие способность гибридизоваться с целевыми последовательностями ДНК. Зонды можно применять в качестве праймеров, но они, по существу, выполнены с возможностью связывания с целевой ДНК или РНК и не применяются в процессе амплификации.

Специфичные праймеры можно применять для амплификации фрагмента встраивания с получением ампликона, который можно применять в качестве "специфичного зонда" для идентификации объекта DP-004114-3 в биологических образцах. Если зонд гибридизовать с нуклеиновыми кислотами биологического образца в условиях, позволяющих зонду связываться с образцом, данное связывание можно обнаружить, что, таким образом, обеспечит указание на наличие объекта DP-004114-3 в биологическом образце. Такая идентификация связанного зонда была описана в данной области. В одном варианте осуществления настоящего изобретения специфический зонд представляет собой последовательность, которая в оптимизированных условиях специфически гибридизируется с областью внутри 5'- или 3'-фланкирующей области объекта, а также содержит часть смежной с ней экзогенной ДНК. Специфический зонд может содержать последовательность, по меньшей мере на 80%, в диапазоне от 80 до 85%, в диапазоне от 85 до 90%, в диапазоне от 90 до 95% и в диапазоне от 95 до 100% идентичную (или комплементарную) специфичной области объекта.

Способы получения и применения зондов и праймеров описаны, например, в публикациях Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 изд., т. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

г. Колд Спринг-Харбор, штат Нью-Йорк, 1989 г. (далее Sambrook et al., 1989 г.); Ausubel et al. под ред., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, г. Нью-Йорк, 1995 г. (с периодическими обновлениями) (далее Ausubel et al., 1995 г.); и Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: г. Сан-Диего, 1990 г. Пары ПЦР-праймеров можно получить из известной последовательности, например, путем применения компьютерных программ, предназначенных для данной цели, таких как инструмент для анализа ПЦР-праймеров в Vector NTI версии 6 (Informax Inc., г. Бетесда, штат Мэриленд, США); PrimerSelect (DNASTAR Inc., г. Мэдисон, штат Висконсин, США); и Primer (версия 0.5©, 1991 г., Институт биомедицинских исследований Уайтхеда, г. Кембридж, штат Массачусетс, США). Кроме того, последовательность можно просканировать визуально и вручную идентифицировать праймеры с применением инструкций, известных обычному специалисту в данной области.

В настоящем документе термин "набор" означает комплект реагентов для цели выполнения вариантов осуществления способа настоящего изобретения, а более конкретно для идентификации объекта DP-004114-3 в биологических образцах. Набор настоящего изобретения можно применять, а его компоненты можно специфически корректировать для целей контроля качества (например, определения чистоты партий семян), обнаружения объекта DP-004114-3 в растительном материале или в материале, содержащем или полученном из растительного материала, такого как, без ограничений, пищевые или кормовые продукты. В настоящем документе термин "растительный материал" означает материал, полученный или происходящий из растения.

Праймеры и зонды, основанные на последовательности фланкирующей ДНК и последовательности вставки, описанных в настоящем документе, можно применять для подтверждения (и при необходимости для коррекции) описанных последовательностей традиционными способами, например путем повторного клонирования и секвенирования таких последовательностей. Нуклеотидные зонды и праймеры настоящего изобретения гибридизируются в строгих условиях с целевой последовательностью ДНК. Для идентификации наличия ДНК из трансгенного объекта в образце можно применять любой традиционный способ гибридизации нуклеиновых кислот или амплификации. Молекулы нуклеиновых кислот или их фрагменты способны в определенных обстоятельствах специфически гибридизоваться с другими молекулами нуклеиновых кислот. В настоящем документе две молекулы нуклеиновых кислот считаются способными к специфической гибридизации друг с другом, если две молекулы могут образовывать антипараллельную двухцепочечную структуру нуклеиновых кислот.

Молекула нуклеиновой кислоты считается "комплементом" другой молекулы нуклеиновой кислоты, если они проявляют полную комплементарность. В настоящем документе молекулы считаются проявляющими "полную комплементарность", если каждый нуклеотид одной из молекул комплементарен нуклеотиду другой молекулы. Две молекулы считаются "минимально комплементарными", если они могут гибридизоваться друг с другом со стабильностью, достаточной для того, чтобы они оставались гибридизованными друг с другом, по меньшей мере, в традиционных условиях "низкой строгости". Аналогичным образом, молекулы считаются "комплементарными", если они могут гибридизоваться друг с другом со стабильностью, достаточной для того, чтобы они оставались гибридизованными друг с другом в традиционных условиях "высокой строгости". Традиционная строгость условий описана в публикациях Sambrook et al., 1989 г., и Haimes et al., в Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, г. Вашингтон, округ Колумбия (1985 г.), поэтому допустимы отклонения от полной комплементарности, если такие отклонения не полностью лишают молекулы способности образовывать двухцепочечную структуру. Чтобы молекула нуклеиновой кислоты могла служить в качестве праймера или зонда, она должна иметь последовательность, достаточно комплементарную для того, чтобы образовывать стабильную двухцепочечную структуру при конкретном используемом растворителе и концентрациях солей.

В реакциях гибридизации специфичность, как правило, зависит от послегибридизационных отмывок, и критическими факторами являются ионная сила и температура итогового раствора для отмывки. Точка плавления (T_m) представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой с полностью подходящим зондом гибридизируется 50% комплементарной целевой последовательности. В случае гибридов ДНК-ДНК T_m можно аппроксимировать по уравнению Meinkoth and Wahl (1984 г.) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ формамида}) - 500/L$; где M - молярность одновалентных катионов, % GC - процентная доля гуанозинового и цитозинового нуклеотидов в ДНК, % формамида - процентная доля формамида в растворе для гибридизации и L - длина гибрида в парах оснований. T_m уменьшается приблизительно на 1°C на каждый 1% несоответствия; таким образом, для гибридизации с последовательностями требуемой идентичности можно регулировать T_m , условия гибридизации и/или отмывки. Например, если осуществляется поиск последовательностей с >90% идентичностью, T_m можно уменьшить на 10°C . По существу, для строгих условий выбирают температуру приблизительно на 5°C ниже T_m для конкретной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH. Однако для условий исключительно высокой строгости можно использовать гибридизацию и/или отмывку при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже T_m ; для условий умеренной строгости можно использовать гибридизацию и/или отмывку при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже

T_m ; для условий низкой строгости можно использовать гибридизацию и/или отмывку при температуре 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже T_m .

Обычному специалисту будет понятно, что с применением уравнения, композиций растворов для гибридизации и отмывки и требуемого T_m , по существу, описываются вариации строгости растворов для гибридизации и/или отмывки. Если требуемая степень несоответствия дает T_m менее 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), предпочтительно увеличить концентрацию SSC так, чтобы можно было применять более высокую температуру. Обширное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в публикациях Tijssen (1993 г.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, ч. I, гл. 2 (Elsevier, г. Нью-Йорк); и Ausubel et al., под ред. (1995 г.) и Sambrook et al. (1989 г.).

В настоящем документе, по существу, гомологичная последовательность представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая будет специфически гибридизоваться с комплементом молекулы нуклеиновой кислоты, с которой ее сравнивают, в условиях высокой строгости. Условия соответствующей строгости, обеспечивающие гибридизацию ДНК, например, 6× хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при температуре приблизительно 45°C с последующей отмывкой 2× SSC при 50°C, известны специалистам в данной области или могут быть найдены в публикации Ausubel et al. (1995 г.), 6.3.1-6.3.6. Как правило, строгими будут условия, в которых концентрация солей составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, как правило, приблизительно концентрация от 0,01 до 1,0М ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и температуре по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Строгие условия также могут достигаться путем добавления дестабилизирующего агента, такого как формамид. Примеры условий низкой строгости включают гибридизацию с буферным раствором, содержащим от 30 до 35% формамида, 1М NaCl, 1% SDS (додецилсульфата натрия) при 37°C, и отмывку в растворе от 1× до 2× SSC (20× SSC = 3,0М NaCl/0,3М цитрата тринатрия) при 50-55°C. Пример условий средней строгости включает гибридизацию в растворе, содержащем от 40 до 45% формамида, 1М NaCl, 1%, SDS при 37°C, и отмывку в 0,5×-1× SSC при 55-60°C. Примеры условий высокой строгости включают гибридизацию в растворе, содержащем 50% формамида, 1М NaCl, 1% SDS при 37°C, и отмывку в 0,1× SSC при 60-65°C. Нуклеиновая кислота настоящего изобретения может специфически гибридизоваться с одной или более молекулами нуклеиновых кислот, уникальными для объекта DP-004114-3, или их комплементами или фрагментами в любых из умеренно строгих условий гибридизации.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Таким образом, определение процентной доли идентичности любых двух последовательностей можно выполнить с применением математического алгоритма. Неограничивающими примерами таких математических алгоритмов являются алгоритм Myers and Miller (1988 г.) CABIOS 4:11-17; алгоритм локальной гомологии из Smith et al. (1981 г.) Adv. Appl. Math. 2:482; алгоритм выравнивания гомологии из Needleman and Wunsch (1970 г.) J. Mol. Biol. 48:443-453; способ поиска сходств из Pearson and Lipman (1988 г.) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; алгоритм из Karlin and Altschul (1990 г.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифицированный в публикации Karlin and Altschul (1993 г.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Для сравнения последовательностей с целью определения идентичности последовательности можно использовать компьютерные реализации данных математических алгоритмов. Такие реализации включают, без ограничений, следующие: CLUSTAL в программе PC/Gene (предложена Intelligenetics, г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США); программа ALIGN (версия 2.0); программа ALIGN PLUS (версия 3.0, авторское право 1997 г.); а также GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, версия 10 (предложена Accelrys, 9685 Scrantom Road, г. Сан-Диего, штат Калифорния 92121, США). Выравнивания с применением данных программ можно осуществлять с применением параметров по умолчанию.

Программа CLUSTAL хорошо описана авторами Higgins and Sharp (1988 г.), Gene 73:237-244; Higgins and Sharp (1989 г.), CABIOS 5:151-153; Corpet, et al., Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988 г.); Huang, et al., Computer Applications in the Biosciences 8:155-65 (1992 г.) и Pearson, et al., Methods in Molecular Biology 24:307-331 (1994 г.). Программы ALIGN и ALIGN PLUS основаны на алгоритме из Myers and Miller (1988 г.), выше. Программы BLAST по Altschul et al. (1990 г.) J. Mol. Biol. 215:403 основаны на алгоритме из Karlin and Altschul (1990 г.) выше. К семейству программ BLAST, которые можно применять для поиска аналогичных фрагментов по базам данных, относятся следующие: BLASTN для ввода запроса на поиск нуклеотидных последовательностей по нуклеотидным последовательностям в базе данных; BLASTX для ввода запроса на поиск нуклеотидных последовательностей по белковым последовательностям в базе данных; BLASTP для ввода запроса на поиск белковых последовательностей по белковым последовательностям в базе данных; TBLASTN для ввода запроса на поиск белковых последовательностей по нуклеотидным последовательностям в базе данных и TBLASTX для ввода запроса на поиск нуклеотидных последовательностей по нуклеотидным последовательностям в базе данных. См. Ausubel, et al. (1995 г.). Выравнивание также можно выполнять вручную путем визуального осмотра.

Для получения выравниваний с пропусками для целей сравнения можно использовать программу Gapped BLAST (в BLAST 2.0), как описано в публикации Altschul et al. (1997 г.) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Альтернативно можно применять PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для выполнения итерационного поиска, позволяющего обнаружить отстоящие отношения между молекулами. См. Altschul et al. (1997 г.) выше. При использовании BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можно применять параметры соответствующих программ (например, BLASTN для нуклеотидных последовательностей, BLASTX для белков) по умолчанию.

В настоящем документе термин "идентичность последовательности" или "идентичность" в контексте двух нуклеотидных или полипептидных последовательностей обеспечивает ссылку на остатки, которые одинаковы в двух последовательностях, при выравнивании для максимального соответствия в установленном окне сравнения. Если термин "процентная доля идентичности последовательностей" применяется в отношении белков, следует понимать, что положения с остатками, не являющимися идентичными, зачастую отличаются консервативными заменами аминокислот, где остатки аминокислот заменяются на другие остатки аминокислот с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью) и поэтому не изменяют функциональные свойства молекулы. Если последовательности отличаются консервативными заменами, процентную долю идентичности последовательностей можно скорректировать в сторону увеличения, чтобы учесть консервативный характер замены. Последовательности, отличающиеся такими консервативными заменами, считаются имеющими "сходство последовательностей" или "сходство". Способы внесения данной корректировки хорошо известны специалистам в данной области. Как правило, при этом консервативную замену считают как частичное, а не полное несовпадение, посредством чего повышая процентную долю идентичности последовательностей. Таким образом, например, если идентичной аминокислоте присваивают значение 1, а неконсервативной замене присваивают нулевое значение, то консервативной замене присваивают значение от нуля до 1. Вычисляют оценку консервативных замен, например, в соответствии с реализацией в программе PC/GENE (Intelligenetics, г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США).

В настоящем документе термин "процентная доля идентичности последовательностей" означает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) в сравнении с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Для расчета процентной доли определяют число положений, в которых в обеих последовательностях имеются идентичные основания нуклеиновых кислот или остатки аминокислот, чтобы получить число совпадающих положений, разделив число совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить процентную долю идентичности последовательностей.

В отношении амплификации целевой нуклеотидной последовательности (например, с помощью ПЦР) с применением конкретной пары праймеров для амплификации, "строгие условия" представляют собой условия, позволяющие паре праймеров гибридизироваться только с целевой нуклеотидной последовательностью, с которой связывался бы праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплемент), с предпочтительным получением уникального продукта амплификации, ампликона, в термической реакции амплификации ДНК.

Термин "специфичный для (целевой последовательности)" указывает на то, что зонд или праймер гибридизуется в строгих условиях гибридизации только с целевой последовательностью в образце, содержащем целевую последовательность.

В настоящем документе "амплифицированная ДНК" или "ампликон" означает продукт амплификации нуклеиновой кислоты целевой нуклеотидной последовательности, являющейся частью матричной нуклеиновой кислоты. Например, чтобы определить, содержит ли растение кукурузы, полученное от полового скрещивания, геномную ДНК трансгенного объекта растения кукурузы настоящего изобретения, ДНК, экстрагированную из образца ткани растения кукурузы, можно подвергнуть способу амплификации нуклеиновой кислоты с применением пары праймеров для ДНК, которая включает первый праймер, полученный из фланкирующей последовательности, смежной с сайтом вставки вставленной гетерологичной ДНК, и второй праймер, полученный из вставленной гетерологичной ДНК, с получением ампликона, позволяющего определить наличие ДНК объекта. Альтернативно второй праймер может быть получен из фланкирующей последовательности. Ампликон имеет длину и последовательность, которые также позволяют определить объект. Длина ампликона может находиться в диапазоне длин от длины, представляющей собой сумму длин пары праймеров плюс одно нуклеотидное основание, до любой длины ампликона, которую можно получить в протоколе амплификации ДНК. Альтернативно пары праймеров можно получить из фланкирующей последовательности с обеих сторон от вставленной ДНК, так чтобы получить ампликон, включающий полную нуклеотидную последовательность вставки экспрессионного конструкта PHP27118, а также последовательность, фланкирующую трансгенную вставку. Член пары праймеров, полученных из фланкирующей последовательности, может быть размещен на расстоянии от вставленной последовательности ДНК, и данное расстояние может находиться в диапазоне от одной пары нуклеотидных оснований до пределов реакции амплификации или приблизительно 20000

п.о. Применение термина "ампликон", в частности, исключает димеры праймеров, которые могут быть образованы в термической реакции амплификации ДНК.

Амплификация нуклеиновой кислоты может осуществляться любым из различных способов амплификации нуклеиновых кислот, известных в данной области, включая ПЦР. В данной области известны и описаны различные способы амплификации, помимо прочего, в патентах США №№ 4683195 и 4683202 и в публикации Innis et al., (1990 г.) выше. Были разработаны способы ПЦР-амплификации, позволяющие выполнить амплификацию геномной ДНК длиной до 22 т.п.о. и ДНК бактериофага длиной до 42 т.п.о. (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994 г.). Данные способы, а также другие известные в данной области способы амплификации ДНК можно применять при практической реализации вариантов осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что может потребоваться скорректировать и несколько модифицировать ряд параметров конкретного протокола ПЦР в соответствии с конкретными лабораторными условиями, и все же это позволит получить аналогичные результаты. Специалисту в данной области будут очевидны данные корректировки.

Ампликон, полученный данными способами, можно обнаружить множеством техник, включая, без ограничений, Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994 г.), где олигонуклеотид ДНК выполнен с возможностью перекрытия как смежной фланкирующей последовательности ДНК, так и вставленной последовательности ДНК. Олигонуклеотид иммобилизуют в лунках микролуночной планшеты. После ПЦР представляющей интерес области (применяется один праймер во вставленной последовательности и один праймер в смежной фланкирующей последовательности) одноцепочечный продукт ПЦР можно гибридизировать с иммобилизованным олигонуклеотидом и использовать в качестве матрицы для реакции элонгации на одно основание с применением ДНК-полимеразы и мечением ddNTP, специфичными для следующего ожидаемого основания. Считывание может быть флуоресцентным или проводиться на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Сигнал указывает на наличие вставленной/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и элонгации на одно основание.

Другой способ обнаружения - это техника пиросеквенирования, описанная в публикации Winge (2000 г.) Innov. Pharma. Tech. 00:18-24. В данном способе создан олигонуклеотид, перекрывающий соединение смежной ДНК и ДНК вставки. Олигонуклеотид гибридизируют с одноцепочечным продуктом ПЦР из представляющей интерес области (один праймер во вставленной последовательности и один - во фланкирующей последовательности) и инкубируют при наличии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденозин-5'-фосфосульфата и люциферина. По отдельности добавляют dNTP, и встраивание приводит к световому сигналу, который измеряют. Световой сигнал указывает на наличие трансгенной вставки/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и элонгации на одно или множество оснований.

Также способом, который можно применять для обнаружения ампликона настоящего изобретения, является способ поляризационной флуоресценции, описанный в публикации Chen et al., (1999 г.) Genome Res. 9:492-498. При применении данного способа был создан олигонуклеотид, перекрывающий соединение фланкирующей и вставленной ДНК. Олигонуклеотид гибридизируют с одноцепочечным продуктом ПЦР из представляющей интерес области (один праймер во вставленной ДНК и один - во фланкирующей последовательности) и инкубируют при наличии ДНК-полимеразы и флуоресцентно меченого ddNTP. Элонгация на одно основание приводит к встраиванию ddNTP. Встраивание можно измерить по изменению поляризации с применением флуориметра. Изменение поляризации указывает на наличие трансгенной вставки/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и элонгации на одно основание.

Способ Taqman® (PE Applied Biosystems, г. Фостер-Сити, штат Калифорния, США) описан как способ обнаружения и количественной оценки наличия последовательности ДНК, и он полностью понятен из инструкций, предложенных производителем. Вкратце, был создан олигонуклеотидный FRET-зонд, перекрывающий соединение фланкирующей ДНК и ДНК вставки. Проводят циклы с FRET-зондом и ПЦР-праймерами (один праймер в последовательности ДНК вставки и один - во фланкирующей геномной последовательности) при наличии термостабильной полимеразы и dNTP. Гибридизация FRET-зонда приводит к расщеплению и высвобождению флуоресцентного фрагмента от гасящего фрагмента на FRET-зонде. Флуоресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей последовательности/последовательности трансгенной вставки вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Были описаны молекулярные маяки для применения при обнаружении последовательности, как описано в публикации Tyangi et al. (1996 г.) Nature Biotech. 14:303-308. Вкратце, был создан олигонуклеотидный FRET-зонд, перекрывающий соединение фланкирующей ДНК и ДНК вставки. Благодаря уникальной структуре FRET-зонда он содержит вторичную структуру, в которой флуоресцентный и гасящий фрагменты находятся очень близко. Проводят циклы с FRET-зондом и ПЦР-праймерами (один праймер в последовательности ДНК вставки и один - во фланкирующей последовательности) при наличии термостабильной полимеразы и dNTP. После успешной ПЦР-амплификации гибридизация FRET-зонда с целевой последовательностью приводит к удалению вторичной структуры зонда и пространственному разделению флуоресцентного и гасящего фрагментов. Это позволяет получить флуоресцентный сигнал. Флуо-

ресцентный сигнал указывает на наличие фланкирующей последовательности/последовательности трансгенной вставки вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Реакция гибридизации с применением зонда, специфичного для последовательности, находящейся внутри ампликона, является другим способом, применяемым для обнаружения ампликона, полученного с помощью ПЦР-реакции. Объект маиса DP-004114-3 эффективен в отношении насекомых-вредителей, включая насекомых, выбранных из отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera и т.д., в частности Coleoptera и Lepidoptera.

К насекомым из отряда Lepidoptera относятся, без ограничений, гусеницы, озимые совки, пяденицы и совки из семейства Noctuidae: *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совка-ипсилон); *A. orthogonia* Morrison (совка прямоугольная); *A. segetum* Denis & Schifferrmüller (совка озимая); *A. subterranea* Fabricius (совка зернистая); *Alabama argillacea* Hübner (совка); *Anticarsia gemmatilis* Hübner (гусеница, вредящая соевым культурам); *Athetis mindara* Barnes and McDunnough (гусеница озимой совки); *Earias insulana* Boisduval (шиповатый червь); *E. vittella* Fabricius (совка хлопковая); *Egira* (*Xylomyges*) *curialis* Grote (цитрусовая совка); *Euxoa messoria* Harris (темнобокая совка); *Helicoverpa armigera* Hübner (совка хлопковая); *H. zea* Boddie (совка хлопковая американская или совка хлопковая); *Heliothis virescens* Fabricius (листовертка-почкоед); *Hypana scabra* Fabricius (вредитель клевера); *Hyponomeuta taltula* Schaus; (*Mamestra configurata* Walker; *M. brassicae* Linnaeus; *Melanchra picta* Harris (совка); *Mocis latipes* Guenée; *Pseudaletia unipuncta* Haworth (гусеница); *Pseudoplusia includens* Walker (соевая совка); *Richia albicosta* Smith; *Spodoptera frugiperda* JE Smith (совка травяная); *S. exigua* Hübner (совка малая); *S. litura* Fabricius; *Trichoplusia ni* Hübner (совка ни); сверлильщики, чехликовые моли, паутинные гусеницы, конусные черви и скелетирующие вредители из рода *Pyralidae* и *Crambidae*, такие как *Achroia grisella* Fabricius (моль мелкая вошинная); *Amyelois transitella* Walker; *Anagasta kuehniella* Zeller (огневка амбарная); *Cadra cautella* Walker (огневка сухофруктовая); *Chilo partellus* Swinhoe; *C. suppressalis* Walker; *C. terrenellus* Pagenstecher (точильщик стеблей сахарного тростника); *Corcyra cephalonica* Stainton (огневка рисовая); *Crambus caliginosellus* Clemens; *C. teterrellus* Zincken; *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (листовертка рисовая); *Desmia funeralis* Hübner (листовертка виноградная); *Diaphania hyalinata* Linnaeus; *D. nitidalis* Stoll (огневка); *Diatraea flavipennella* Box; *D. grandiosella* Dyar (огневка кукурузная юго-западная); *D. saccharalis* Fabricius; *Elastopalpus lignosellus* Zeller; *Eoreuma loftini* Dyar; *Ephestia elutella* Hübner (огневка табачная (шоколадная)); *Galleria mellonella* Linnaeus (большая восковая моль); *Hedylepta accepta* Butler; *Herpetogramma licarsisalis* Walker (луговой мотылек); *Homoeosoma electellum* Hulst (огневка подсолнечниковая); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (мотылек луговой); *Maruca testulalis* Geyer (огневка акациевая); *Orthaga thyrisalis* Walker; *Ostrinia nubilalis* Hübner (мотылек кукурузный); *Plodia interpunctella* Hübner (моль индийская мучная); *Scirpophaga incertulas* Walker; *Udea rubigalis* Guenée (огневка ржаво-коричневая); а также листовертки, почкоеды, плодожорки и вредители плодов из семейства *Tortricidae* *Acleris gloverana* Walsingham; *A. variana* Fernald; *Adoxophyes orana* Fischer von Rösslerstamm (сетчатая листокрытка); виды *Archips*, включая *A. argyrospila* Walker (листовертка плодовых деревьев) и *A. rosana* Linnaeus (листовертка розанная); виды *Argyrotaenia*; *Bonagota salubricola* Meyrick; виды *Choristoneura*; *Cochylis hospes* Walsingham; *Cydia latiferreana* Walsingham; *C. pomonella* Linnaeus (яблоневая плодожорка); *Endopiza viteana* Clemens (листовертка виноградная); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (листовертка гроздевая); *Grapholita molesta* Busck (листовертка восточная персиковая); *Lobesia botrana* Denis & Schifferrmüller; *Platynota flavedana* Clemens (пестрая листовертка); *P. stultana* Walsingham; *Spilonota ocellana* Denis & Schifferrmüller; и *Suleima helianthana* Riley.

Другие выбранные сельскохозяйственные вредители из отряда Lepidoptera, включают, без ограничений, *Alsophila pometaria* Harris; *Anarsia lineatella* Zeller (плодожорка урюковая); *Anisota senatoria* J.E. Smith; *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville; *Bombyx mori* Linnaeus (тутовый шелкопряд); *Bucculatrix thurberiella* Busck (сверлильщик хлопковый); *Colias eurytheme* Boisduval (гусеница совки люцерновой); *Datana integerrima* Grote & Robinson; *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov; *Ennomos subsignaria* Hübner; *Eranis tiliaria* Harris (пяденица липовая); *Erechthias flavistriata* Walsingham; *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (златогузка); *Harrisina americana* Guérin-Méneville; *Heliothis subflexa* Guenée; *Hemileuca oliviae* Cockrell; *Hyphantria cunea* Drury (американская белая бабочка); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (томатная острница); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst; *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst; *Leucoma salicis* Linnaeus (волнянка ивовая); *Lymantria dispar* Linnaeus (непарный шелкопряд); виды *Malacosoma*; *Manduca quinquemaculata* Haworth (бражник пятиточечный); *M. sexta* Haworth (бражник пятиточечный, бражник табачный); *Operophtera brumata* Linnaeus (пяденица зимняя); виды *Orgyia*; *Paleacrita vernata* Peck; *Papilio cresphontes* Cramer; *Phryganidia californica* Packard; *Phyllocnistis citrella* Stainton; *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (плодовая нижнеминирующая моль-пестрянка); *Pieris brassicae* Linnaeus (капустная белянка); *P. rapae* Linnaeus (белянка репная); *P. napi* Linnaeus (брюквенница); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пальцекрылка артишоковая); *Plutella xylostella* Linnaeus (моль капустная); *Pectinophora gossypiella* Saunders (розовый коробочный червь); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte; *Sabulodes aegrotata* Guenée; *Schizura concinna* J.E. Smith; *Sitotroga cerealella* Olivier (моль зерновая); *Telchin licus* Drury; *Thaumetopoea pityocampa* Schifferrmüller; *Tineola bisselliella* Hummel; *Tuta absoluta* Meyrick *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаевая моль).

Представляют интерес личинки и взрослые особи отряда Coleoptera, включая жуков из семейств Anthribidae, Bruchidae и Curculionidae, включая, без ограничений: *Anthonomus grandis* Boheman (долгоносик хлопковый); *Cylindrocopturus adspersus* LeConte; *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus; *Hypera punctata* Fabricius (слоник листовой бобовый); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (долгоносик рисовый водяной); *Metamasius hemipterus hemipterus* Linnaeus; *M. hemipterus sericeus* Olivier; *Sitophilus granarius* Linnaeus (долгоносик амбарный); *S. oryzae* Linnaeus (долгоносик рисовый); *Smicronyx fulvus* LeConte (красный долгоносик подсолнечника); *S. sordidus* LeConte (серый долгоносик подсолнечника); *Sphenophorus maidis* Chittenden (долгоносик кукурузный); *S. livis* Vaurie; *Rhabdoscelus obscurus* Boisduval; земляные блошки, листоеды, вредители, повреждающие корни, листогрызы, колорадские жуки и минирующие мушки из семейства Chrysomelidae, включая, без ограничений: *Chaetocnema ectypa* Horn (блошка стеблевая хлебная); *C. pulicaria* Melsheimer (блоха стеблевая); *Colaspis brunnea* Fabricius; *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (блошка длинноусая); *D. undecimpunctata howardi* Barber (блошка одиннадцатиточечная Говарда); *D. virgifera virgifera* LeConte (западный кукурузный жук); *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадский жук); *Oulema melanopus* Linnaeus (пьявица красногрудая); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блошка стеблевая); *Zygogramma exclamations* Fabricius (совка подсолнечниковая восклицательная); жуки из семейства Coccinellidae, включая, без ограничений: *Epilachna varivestis* Mulsant; хрущи и другие жуки из семейства Scarabaeidae, включая, без ограничений: *Antitrogon parvulus* Britton; *Cyclocephala borealis* Arrow (майский хрущ); *C. immaculata* Olivier; *Dermolepida albobirtum* Waterhouse; *Euethola humilis rugiceps* LeConte; *Lepidiota frenchi* Blackburn; *Tomarus gibbosus* De Geer (жук морковный); *T. subtropicus* Blatchley; *Phyllophaga crinita* Burmeister (личинка майского хруща); *P. latifrons* LeConte (июньский хрущ); *Popillia japonica* Newman (хрущик японский); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky; кожееды из семейства Dermestidae; проволочники из семейства Elateridae, виды *Eleodes*, виды *Melanotus*, включая *M. communis* Gyllenhal (проволочник); виды *Conoderus*; виды *Limonius*; виды *Agriotes*; виды *Ctenicera*; виды *Aeolus*; короеды из семейства Scolytidae; жуки из семейства Tenebrionidae; жуки из семейства Cerambycidae, такие как, без ограничений, *Migdolus fryanus* Westwood (жук-дровосек); и жуки из семейства Buprestidae, включая, без ограничений, *Aphanisticus cochinchinae seminulum* Obenberger.

Представляют интерес взрослые и незрелые особи из отряда Diptera, включая минирующих мух *Agromyza parvicornis* Loew; галлицы, включая, без ограничений: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлица сорговая); *Mayetiola destructor* Say (гессенская муха); *Neolasioptera murtfeldtiana* Felt; *Sitodiplosis mosellana* Géhin (галлица злаковая оранжевая); плодовые мушки (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (шведская мушка); личинки насекомых, включая, без ограничений: виды *Delia*, включая *Delia platura* Meigen; *D. coarctata* Fallen (муха озимая); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (малая комнатная муха); *Meromyza americana* Fitch (личинка американской меромизы); *Musca domestica* Linnaeus (комнатные мухи); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалки осенние); полевые мухи, коровьи жигалки, мясные мухи, виды *Chrysomya*; виды *Phormia*; а также другие мухообразные летающие вредители, слепни видов *Tabanus*; носоглоточные оводы видов *Gastrophilus*; видов *Oestrus*; бычьи оводы видов *Hypoderma*; оленьи слепни видов *Chrysops*; *Melophagus ovinus* Linnaeus (кровососки); а также другие *Brachycera*, комары видов *Aedes*; видов *Anopheles*; видов *Culex*; мошки видов *Prosimulium*; видов *Simulium*; мокрецы, москиты, сциариды и другие Nematocera.

К представляющим интерес насекомым относятся насекомые отряда Hemiptera, включая, без ограничений, следующие семейства: Adelgidae, Aleyrodidae, Aphididae, Asterolecaniidae, Cercopidae, Cicadellidae, Cicadidae, Cixiidae, Coccidae, Coreidae, Dactylopiidae, Delphacidae, Diaspididae, Eriococcidae, Flatidae, Fulgoridae, Issidae, Lygaeidae, Margarodidae, Membracidae, Miridae, Ortheziidae, Pentatomidae, Phoenicococcidae, Phylloxeridae, Pseudococcidae, Psyllidae, Pyrrhocoridae и Tingidae.

К значимым с агрономической точки зрения членам отряда Hemiptera относятся, без ограничений: *Acrosternum hilare* Say (щитник); *Acyrtosiphon pisum* Harris (тля гороховая); виды *Adelges* (хермесы); *Adelphocoris rapidus* Say; *Anasa tristis* De Geer (клоп-ромбовик печальный); *Aphis craccivora* Koch (тля люцерновая); *A. fabae* Scopoli (тля свекловичная); *A. gossypii* Glover (тля хлопковая, тля бахчевая); *A. maidiradicis* Forbes (тля кукурузная корневая); *A. pomi* De Geer (тля яблонная); *A. spiraeicola* Patch; *Aulacaspis tegalensis* Zehntner; *Aulacorthum solani* Kaltenbach (тля картофельная); *Bemisia tabaci* Gennadius; *B. argentifolii* Bellows & Perring; *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клоп-черепашка пшеничный североамериканский); виды *Blotomatidae*; *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (тля капустная); *Cacopsylla pyricola* Foerster (медяница грушевая); *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (тля земляничная); виды *Cimicidae*; виды *Coreidae*; *Corythucha gossypii* Fabricius (клоп хлопковый); *Cyrtopeltis modesta* Distant (помидорный жук); *C. notatus* Distant; *Deois flavopicta* Stål (пенница); *Dialeurodes citri* Ashmead (белокрылка цитрусовая); *Diaphnocoris chlorionis* Say; *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (русская пшеничная тля); *Diplachionaspis divergens* Green (щитовка); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (тля розовая); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (красноклоп хлопковый); *Dysmicoccus boninensis* Kuwana; *Empoasca fabae* Harris (цикадка картофельная); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (тля кровавая яблонная); виды *Erythroneoura* (виноградные цикадки); *Eumetopina flavipes* Muir; виды *Eurygaster*; *Euschistus servus* Say; *E. variolarius* Palisot de Beauvois; виды *Graptostethus* (комплекс наземников); а также *Hyalopterus pruni* Geoffroy (тля мучнистая сливовая); *Icerya purchasi* Maskell (червец австралийский же-

лобчатый); *Labopidicola allii* Knight; *Laodelphax striatellus* Fallen; *Leptoglossus corculus* Say; *Leptodictya tabida* Herrich-Schaeffer; *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (тля горчичная листовая); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus; *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп травяной); *L. hesperus* Knight; *L. pratensis* Linnaeus; *L. rugulipennis* Poppius; *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (тля картофельная листовая); *Macrosteles quadrilineatus* Forbes; *Magicicada septendecim* Linnaeus (периодическая цикада); *Mahanarva fimbriolata* Stål; *M. posticata* Stål; *Melanaphis sacchari* Zehntner; *Melanaspis glomerata* Green; *Metopolophium dirhodum* Walker (тля розанно-злаковая); *Myzus persicae* Sulzer (тля персиковая зеленая); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (тля цикориево-смородиновая); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадка зеленая); *N. nigropictus* Stål (рисовая цикадка); *Nezara viridula* Linnaeus; *Nilaparvata lugens* Stål; *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (низиус вересковый); *Oebalus pugnax* Fabricius; *Oncopeltus fasciatus* Dallas; *Orthops campestris* Linnaeus; виды *Pemphigus* (корневые тли и галловые тли); *Peregrinus maidis* Ashmead; *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy; *Phylloxera devastatrix* Pergande (филлоксе́ра гикори); *Planococcus citri* Risso (червец цитрусовый); *Plesiocoris rugicollis* Fallen; *Poecillocapsus lineatus* Fabricius; *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter; виды *Pseudococcus* (другой комплекс червецов); *Pulvinaria elongata* Newstead; *Pyrilla perpusilla* Walker; виды *Pyrrhocoridae*; *Quadraspidotus perniciosus* Comstock (щитовка калифорнийская); виды *Reduviidae*; *Rhopalosiphum maidis* Fitch (тля кукурузная); *R. padi* Linnaeus; *Saccharicoccus sacchari* Cockerell; *Scaptocoris castanea* Perty; *Schizaphis graminum* Rondani (злаковая тля); *Sipha flava* Forbes (тля желтая сахарного тростника); *Sitobion avenae* Fabricius (тля листовая); *Sogatella furcifera* Horvath; *Sogatodes oryzicola* Muir; *Spanagonicus albofasciatus* Reuter; *Therioaphis maculata* Buckton (тля клеверная); виды *Tinidae*; *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (тля чайная); и *T. citricida* Kirkaldy (тля цитрусовая); *Trialeurodes abutiloneus* и *T. vaporariorum* Westwood (белокрылка тепличная); *Trioza diospyri* Ashmead (листоблешка хурмовая) и *Typhlocyba pomaria* McAtee (цикадка яблонная).

Также в этот список включены взрослые особи и личинки отряда *Acari* (клещи), такие как *Aceria tosicella* Keifer (луковичный клещ тюльпанов); *Panonychus ulmi* Koch (клещ красный плодовой); *Petrobia latens* Müller; *Steneotarsonemus bancrofti* Michael; паутинные клещи и красные клещи семейства *Tetranychidae*, *Oligonychus grypus* Baker & Pritchard, *O. indicus* Hirst, *O. pratensis* Banks, *O. stickneyi* McGregor; *Tetranychus urticae* Koch (клещик паутинный двухпятнистый); *T. mcdanieli* McGregor; *T. cinnabarinus* Boisduval (красный паутинный клещ); *T. turkestanus* Ugarov & Nikolski (клещик паутинный атлантический), плоские клещи из семейства *Tenuipalpidae*, *Brevipalpus lewisi* McGregor; галловые и почечные клещи из семейства *Eriophyidae* и другие питающиеся листвой клещи и клещи, важные для здоровья человека и животных, т.е. пылевые клещи из семейства *Epidermoptidae*, железницы из семейства *Demodiciidae*, зерновые клещи из семейства *Glycyphagidae*, клещи из отряда *Ixodidae*. *Ixodes scapularis* Say (черноногий клещ); *I. holocyclus* Neumann; *Dermacentor variabilis* Say (иксодовый собачий клещ); *Amblyomma americanum* Linnaeus (иксодовый клещ *Amblyomma*); а также конские и чесоточные клещи из семейств *Psoroptidae* и *Sarcoptidae*.

Интерес представляют насекомые-вредители из отряда *Thysanura*, такие как *Lepisma saccharina* Linnaeus (чешуйница); *Thermobia domestica* Packard (чешуйница домашняя).

К дополнительным членистоногим-вредителям относятся пауки из отряда *Araneae*, такие как *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (коричневый паук-отшельник); и *Latrodectus mactans* Fabricius (паук "черная вдова"); а также многоножки из отряда *Scutigera*, такие как *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (мухоловка обыкновенная). Кроме того, представляют интерес насекомые-вредители из отряда *Isoptera*, включая насекомых из семейства *Termitidae*, такие как, без ограничений, *Cornitermes cumulans* Kollar, *Cylindrotermes nordenskiöldi* Holmgren и *Pseudacanthotermes militaris* Hagen; а также из семейства *Rhinotermitidae*, включая, без ограничений, *Heterotermes tenuis* Hagen. Также представляют интерес насекомые из отряда *Thysanoptera*, включая, без ограничений, трипсы, такие как *Stenchaetothrips minutus* van Deventer.

Варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно определены в представленных ниже примерах. Следует понимать, что данные примеры приведены только для целей иллюстрации. Из представленного выше описания и данных примеров специалист в данной области может установить важные характеристики данного изобретения и провести различные изменения и модификации вариантов осуществления настоящего изобретения для адаптации его к различным условиям и типам применения без отклонения от его сущности и объема. Таким образом, различные модификации вариантов осуществления настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в настоящем документе будут очевидны специалистам в области на основании представленного выше описания. Считается, что такие модификации также входят в объем приложенных пунктов формулы изобретения.

Представленное в настоящем документе описание, соответствующее каждой ссылке, полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Примеры

Пример 1. Трансформация маиса путем трансформации *Agrobacterium* и регенерации трансгенных растений, содержащих гены *Cry1F*, *Cry34Ab1*, *Cry35Ab1* (*Cry34/35Ab1*) и *Pat*.

Маис 4114 получили путем опосредованной *Agrobacterium* трансформации плазмидой *PHP27118*. Данный объект содержит генные кассеты *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* и *pat*, придающие устойчивость к

определенным вредителям из отрядов чешуекрылые и жесткокрылые.

В частности, первая кассета содержит укороченную версию гена *cry1F* из *Bt* var. *aizawai*. Вставка гена *cry1F* придает устойчивость к повреждению вредителями отряда чешуекрылые, включая ЕСВ и FAW. Белок *Cry1F* (SEQ ID NO: 1) образован из 605 аминокислот и имеет молекулярный вес приблизительно 68 кДа. Управление экспрессией гена *cry1F* осуществляется промотором полиубиквитина маиса (Christensen et al., 1992 г., выше), обеспечивающим конститутивную экспрессию белка *Cry1F* в маисе. Данная область также включает 5'-UTR и интрон, связанные с нативным промотором полиубиквитина. Терминатором для гена *cry1F* является сигнал добавления poly(A) из открытой рамки считывания 25 (ORF 25) Ti-плазмиды pTi15955 *Agrobacterium tumefaciens* (A. *tumefaciens*) (Barker et al. 1983 г., выше).

Вторая кассета содержит ген *cry34Ab1*, выделенный из *Bt*, штамм PS149B1 (патенты США №№ 6127180; 6624145 и 6340593). Белок *Cry34Ab1* (SEQ ID NO: 2) имеет длину 123 аминокислотных остатка и молекулярный вес приблизительно 14 кДа.

Управление экспрессией гена *cry34Ab1* осуществляется второй копией промотора полиубиквитина маиса с 5'-UTR и интроном (Christensen et al., 1992 г., выше). Терминатором для гена *cry34Ab1* является терминатор *pinII* (Keil et al., 1986 г., выше; An et al., 1989 г., выше).

Третья генная кассета содержит ген *cry35Ab1*, также выделенный из *Bt*, штамм PS149B1 (патенты США №№ 6083499; 6548291 и 6340593). Белок *Cry35Ab1* (SEQ ID NO: 3) имеет длину 383 аминокислоты и молекулярный вес приблизительно 44 кДа. Одновременная экспрессия в растении белков *Cry34Ab1* и *Cry35Ab1* придает устойчивость к насекомым отряда жесткокрылые, включая WCRW. Управление экспрессией гена *cry35Ab1* осуществляется промотором пероксидазы *Triticum aestivum* (пшеница) и лидерной последовательностью (Hertig et al. 1991 г., выше). Терминатором для гена *cry35Ab1* является вторая копия терминатора *pinII* (Keil et al. 1986 г., выше; An et al. 1989 г., выше).

Четвертая и последняя генная кассета содержит версию *pat* из *Streptomyces viridochromogenes*, оптимизированную для экспрессии в маисе. Ген *pat* экспрессирует PAT, который придает устойчивость к фосфинотрицину (глюфосинату аммония). Белок PAT (SEQ ID NO: 4) имеет длину 183 аминокислотных остатка и молекулярный вес приблизительно 21 кДа. Управление экспрессией гена *pat* осуществляется промоторной и терминаторной областями из транскрипта CaMV 35S (Franck et al., 1980 г., выше; Odell et al., 1985 г., выше; Pietrzak, et al., 1986 г., выше). Также предложены растения, содержащие ДНК-конструкты. Описание генетических элементов Т-ДНК PHP27118 (SEQ ID NO: 5) и их источники дополнительно описаны в табл. 1.

Таблица 1

Генетические элементы в области Т-ДНК плазмиды PHP27118

Местоположение на Т-ДНК (положение в п.о.)	Генетический элемент	Размер (п.о.)	Описание
1 в 25	Правая граница		ПГ-область Т-ДНК Ti-плазмиды <i>A. tumefaciens</i>
26 в 76	Область Ti-плазмиды	25	Нефункциональная последовательность из Ti-плазмиды <i>A. tumefaciens</i>
77 в 114	Область полилинкера	51	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
115 в 1014	Промотор <i>ubiZM1</i>	38	Область промотора из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> (Christensen et al., 1992 г., выше)
1015 в 1097	5'-UTR <i>ubiZM1</i>	900	5'-UTR из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> . То же.
1098 в 2107	Интрон <i>ubiZM1</i>	83	Область интрона из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> . То же.

2108 в 2129	Область полилинкера	1010	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
2130 в 3947	Ген <i>cry1F</i>	22	Укороченная версия <i>cry1F</i> из <i>Bt</i> var. <i>aizawai</i>
3948 в 3992	Область полилинкера	1818	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
3993 в 4706	Терминатор ORF 25	45	Терминаторная последовательность из <i>A. tumefaciens</i> pTi15955 ORF 25 (Barker <i>et al.</i> , 1983 г., выше)
4707 в 4765	Область полилинкера	714	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
4766 в 5665	Промотор <i>ubiZM1</i>	59	Область промотора из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992 г., выше)
5666 в 5748	5'-UTR <i>ubiZM1</i>	900	5'-UTR из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> . То же.
5749 в 6758	Инtron <i>ubiZM1</i>	83	Область интрона из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> . То же.
6759 в 6786	Область полилинкера	1010	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
6787 в 7158	Ген <i>cry34Ab1</i>	28	Синтетическая версия <i>cry34Ab1</i> , кодирующего белок 14 кДа параспорального кристалла дельта-эндотоксина из неподвижного штамма PS149B1 <i>Bt</i> (Moellenbeck <i>et al.</i> (2001 г.) <i>Nature Biotech.</i> 19:668–672; Ellis <i>et al.</i> (2002 г.) <i>Appl. Env. Microbiol.</i> 68(3):1137–1145; Herman <i>et al.</i> (2002 г.) <i>Environ. Entomol.</i> 31(2):208–214.)
7159 в 7182	Область полилинкера	372	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
7183 в 7492	Терминатор <i>pinII</i>	24	Терминаторная область из гена ингибитора протеиназы II <i>Solanum tuberosum</i> (Keil <i>et al.</i> 1986 г., выше; An <i>et al.</i> 1989 г., выше)
7493 в 7522	Область полилинкера	310	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
7523 в 8820	Промотор пероксидазы TA	30	Промотор из пероксидазы <i>Triticum aestivum</i> , включая лидерную последовательность (Hertig <i>et al.</i> 1991 г., выше)
8821 в 8836	Область полилинкера	1298	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
8837 в 9988	<i>cry35Ab1</i>	16	Синтетическая версия <i>cry35Ab1</i> , кодирующего белок 44 кДа параспорального кристалла дельта-эндотоксина из неподвижного штамма PS149B1 <i>Bt</i> (Moellenbeck <i>et al.</i> 2001 г., выше; Ellis <i>et al.</i> 2002 г., выше; Herman <i>et al.</i> 2002 г., выше)

9989 в 10012	Область полилинкера	1152	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
10013 в 10322	Терминатор pinII	24	Терминаторная область из гена ингибитора протеиназы II <i>Solanum tuberosum</i> (Keil et al. 1986 г., выше; An et al. 1989 г., выше)
10323 в 10367	Область полилинкера	310	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
10368 в 10897	CaMV Промотор 35S	45	Промотор 35S из CaMV (Franck et al., 1980 г., выше; Odell et al., 1985 г., выше; Pietrzak, et al., 1986 г., выше)
10898 в 10916	Область полилинкера	530	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
10917 в 11468	Ген <i>pat</i>	19	Синтетическая оптимизированная для растения кодирующая последовательность фосфинотрицинацетилтрансферазы из <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
11469 в 11488	Область полилинкера	552	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
11489 в 11680	Терминатор CaMV35S	20	Терминатор 35S из CaMV (Franck et al., 1980 г., выше; Pietrzak, et al., 1986 г., выше)
11681 в 11756	Область полилинкера	192	Область, необходимая для клонирования генетических элементов
11757 в 11953	Область Ti-плазмиды	76	Нефункциональная последовательность из Ti-плазмиды <i>A. tumefaciens</i>
11954 в 11978	Левая граница	197	ЛГ-область Т-ДНК из Ti-плазмиды <i>A. tumefaciens</i>

Незрелые зародыши маиса (*Zea mays* L.) асептически удаляли из развивающейся зерновки через девять-одиннадцать дней после опыления и инокулировали *A. tumefaciens*, штамм LBA4404, содержащими плазмиду РНР27118 (фиг. 1), по существу, как описано в публикации Zhao (патент США № 5981840, содержание которого включено в настоящий документ путем ссылки). Область Т-ДНК РНР27118 показана на фиг. 2. Затем через три-шесть дней совместного культивирования зародыша и *Agrobacterium* на твердой культуральной среде без селекции зародыши переносили в среду без селекции по гербицидам, но содержащую карбенициллин. После этого через три-пять дней в данной среде зародыши переносили в селективную среду, которая стимулировала соматический эмбриогенез маиса и содержала биалафос для селекции клеток, экспрессирующих трансген *pat*. Среда также содержала карбенициллин для уничтожения любых остаточных *Agrobacterium*. Через шесть-восемь недель культивации в селективной среде идентифицировали здоровые растущие каллюсы, демонстрирующие устойчивость к биалафосу. Впоследствии потенциальные трансгенные каллюсы регенерировали, получив саженцы Т0.

Из саженцев Т0 отбирали образцы для ПЦР-анализа для проверки наличия и числа копий вставленных генов *cry1F*, *cry35Ab1*, *cry34Ab1*/или *pat*. Было подтверждено, что объект маиса DP-004114-3 содержит одну копию Т-ДНК (см. примеры 2 и 3). В дополнение к данному анализу саженцы Т0 анализировали с помощью ПЦР на наличие определенных последовательностей бинарного векторного каркаса *Agrobacterium* (данные не показаны). Для дальнейшего размножения в теплице определяли растения, имеющие одну копию вставленных генов и отрицательный результат анализа на каркасные последовательности *Agrobacterium*. Среди данных выбранных растений Т0 проводили скрининг на эффективность признаков и экспрессию белка, которые проводили множеством биоанализов (см. пример 5). Растения Т0, удовлетворяющие всем критериям, выращивали и скрещивали с инбредными линиями для получения семени для дальнейшего испытания. Схематичный обзор трансформации и развития объекта представлен на фиг. 3.

Пример 2. Характеризация объекта маиса DP-004114-3.

Геномную ДНК из листовой ткани тестируемого семени от маиса 4114 и контрольного вещества (семя генетически немодифицированного маиса с генетическим окружением, характерным для окружения объекта) выделяли и подвергали качественной ПЦР-амплификации с применением специфичной для конструкта пары праймеров. Продукты ПЦР разделяли на агарозном геле для подтверждения наличия вставленного конструкта в геномной ДНК, выделенной из тестируемого семени, и отсутствия вставленного конструкта в геномной ДНК, выделенной из контрольного семени. Для определения размера продукта ПЦР применяли эталонный стандарт (Low DNA Mass Ladder; Invitrogen Corporation, № по кат. 10380-012). Надежность специфичного для конструкта способа ПЦР оценивали, повторяя эксперимент трижды. Чувствительность ПЦР-амплификации оценивали по различным разведениям геномной ДНК из маиса 4114.

Тестируемые и контрольные образцы листьев (стадия листа V5-V7) собирали с растений, выращен-

ных на экспериментальной станции DuPont (г. Вилмингтон, штат Делавэр, США) из семени, полученного от Pioneer Hi-Bred (г. Джонстон, штат Айова, США). Экстракции геномной ДНК из тестируемой и контрольной листовой тканей проводили с применением стандартного протокола экстракции мочевиной.

Количественное определение геномной ДНК проводили с применением спектрофотометра NanoDrop 1000 с применением программного обеспечения ND-1000 V3.6 (ThermoScientific, г. Вилмингтон, штат Делавэр, США) и реагента Quant-iT PicoGreen® (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США). Образцы ДНК визуализировали на агарозном геле для подтверждения количественных значений и определения качества ДНК.

Образцы геномной ДНК, выделенной из листовой ткани маиса 4114, и контрольные образцы подвергали ПЦР-амплификации (Roche High Fidelity PCR Master Kit, Roche, № по кат. 12140314001) с использованием специфичной для конструкта пары праймеров (SEQ ID NO: 7 и 8), охватывающей терминатор ORF 25 маиса и промотор убиквитина (см. фиг. 2) и позволяющей уникально идентифицировать вставленную Т-ДНК в маисе 4114. Второй набор праймеров (SEQ ID NO: 9 и 10) применяли для амплификации эндогенного гена инвертазы маиса (№ доступа GenBankAF171874.1) в качестве положительного контроля для ПЦР-амплификации. Сайт-мишень для ПЦР и размер ожидаемого продукта ПЦР для каждого набора праймеров показаны в табл. 2. Реагенты для ПЦР и условия реакции показаны в табл. 3. В данном исследовании во всех ПЦР-реакциях применяли 50 нг геномной ДНК листа.

Таблица 2

Сайт-мишень геномной ДНК для ПЦР и ожидаемый размер продуктов ПЦР

Набор праймеров	Сайт-мишень	Ожидаемый размер продукта ПЦР (п.о.)
SEQ ID NO: 7 и 8	Специфичная для конструкта Т-ДНК: терминатор ORF 25 и промотор убиквитина	287
SEQ ID NO: 9 и 10	Эндогенный ген инвертазы маиса	225

Таблица 3

Реагенты ПЦР и условия реакции

Реагенты ПЦР		Условия реакции ПЦР			
Реагент	Объем (мкл)	Элемент цикла	Температура (°C)	Время (с)	№ циклов
Матричная ДНК (25 нг/мкл)	2	Начальная денатурация	94	120	1
Праймер 1 (10 мкМ)	2	Денатурация	94	10	35
Праймер 2 (10 мкМ)	2	Отжиг	65	15	
Мастер-микс для ПЦР*	25	Элонгация	68	60	
ddH ₂ O	19	Итоговая элонгация	68	420	1
---	---	Цикл удержания	4	До анализа	---

ddH₂O: дважды дистиллированная вода

* Roche High Fidelity Master Mix

Продукт ПЦР размером приблизительно 300 п.о., амплифицированный с помощью специфичного для конструкта набора праймеров (SEQ ID NO: 7 и 8), наблюдали в ПЦР-реакциях с применением плазмиды РНР27118 (10 нг) в качестве матрицы, а также во всех образцах ДНК маиса 4114, но он отсутствовал во всех контрольных образцах маиса и в контроле без матрицы. Данный эксперимент повторяли трижды, и были получены аналогичные результаты. Результаты, наблюдавшиеся для экстрактов ДНК из пяти растений маиса 4114 и пяти контрольных растений маиса, хорошо соответствовали ожидаемому размеру (287 п.о.) продукта ПЦР для образцов, содержащих геномную ДНК маиса 4114. Продукт ПЦР размером приблизительно 220 п.о. наблюдали как в образцах маиса 4114, так и в контрольных образцах маиса после ПЦР-реакции с набором праймеров (SEQ ID NO: 9 и 10) для обнаружения эндогенного гена инвертазы маиса. Данные результаты хорошо соответствовали ожидаемому размеру продукта ПЦР (225 п.о.) для образцов геномной ДНК, содержащих эндогенный ген инвертазы маиса. Полоса эндогенной целевой мишени не наблюдалась в контроле без матрицы.

Для оценки чувствительности ПЦР-амплификации различные концентрации одного образца ДНК из маиса 4114 разводили в генетически немодифицированной контрольной ДНК, в результате чего получали количества ДНК маиса 4114 в диапазоне от 500 фг, 5 пг, 10 пг, 50 пг, 100 пг, 500 пг, 5 нг и 50 нг

(общее количество геномной ДНК во всех образцах ПЦР составило 50 нг). Каждое разведение подвергали ПЦР-амплификации, как описано ранее. На основе данного анализа определяли предел обнаружения (LOD), который составил приблизительно 100 пг ДНК маиса 4114 в 50 нг общей ДНК или 0,2% ДНК маиса 4114.

В заключение качественный ПЦР-анализ с использованием специфичного для конструкта набора праймеров для маиса 4114 подтвердил, что тестируемые растения содержали вставленную Т-ДНК из плазмиды РНР27118, о чем свидетельствует наличие специфической для конструкта целевой полосы во всех анализируемых образцах тестового растения и отсутствие в генетически немодифицированных контрольных растениях. Данный результат был воспроизводимым. Как тестируемые, так и контрольные растения содержали эндогенный ген инвертазы маиса. Чувствительность анализа в описанных условиях составила приблизительно 100 пг геномной ДНК маиса 4114 в 50 нг общей геномной ДНК или 0,2% геномной ДНК маиса 4114.

Пример 3. Анализ маиса DP-004114-3 на целостность и число копий методом Саузерн-блоттинга.

Анализ методом Саузерн-блоттинга применяли для подтверждения целостности и числа копий вставленной Т-ДНК из РНР27118, а также для подтверждения наличия генных кассет *cyu1F*, *cyu34Ab1*, *cyu35Ab1* и *pat* в маисе 4114.

Для анализа методом Саузерн-блоттинга выбирали пять отдельных растений из поколения T1 маиса 4114. Материал молодого листа собирали с растений маиса 4114 (тестируемых) и нетрансгенного маиса (контрольных) и немедленно помещали на сухой лед. Замороженные образцы лиофилизировали и геномную ДНК экстрагировали из тестируемой и контрольной тканей с применением способа экстракции с помощью цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ).

После расщеплений рестрикционным ферментом, как описано ниже, фрагменты ДНК разделяли на агарозных гелях, депуринировали, денатурировали, нейтрализовали *in situ* и переносили на нейлоновую мембрану в буфере 20× SSC способом, описанным для системы TURBOBLOTTER™ Rapid Downward Transfer System (Schleicher & Schuell). После переноса на мембрану ДНК связывали с мембраной путем поперечного сшивания ультрафиолетовым светом.

Целостность.

Для анализа на целостность методом Саузерн-блоттинга выбирали рестрикционный фермент *Hind* III, так как внутри Т-ДНК размещены три сайта (фиг. 2). Приблизительно 1-3 мкг геномной ДНК расщепляли *Hind* III и разделяли по размеру на агарозном геле. В качестве положительного контроля в образец ДНК контрольного растения вносили приблизительно 15 пг плазмиды, содержащей Т-ДНК РНР27118, проводили расщепление и наносили на агарозный гель. Также использовали отрицательный контроль для проверки фоновой гибридизации зонда с геномом маиса.

Для гибридизации с целью подтверждения наличия генов применяли четыре зонда, гомологичные генам *cyu1F*, *cyu34Ab1*, *cyu35Ab1* и *pat* на Т-ДНК РНР27118 (генные элементы, см. фиг. 2). Для создания зондов фрагменты генов, гомологичных *cyu1F*, *cyu34Ab1*, *cyu35Ab1* и *pat*, получали с помощью ПЦР из плазмиды, содержащей Т-ДНК РНР27118, разделяли по размеру на агарозном геле и очищали с применением набора для экстракции из геля QIAquick® (Qiagen). Впоследствии все ДНК-зонды получали из фрагментов с применением системы Rediprime™ II DNA Labeling System (Amersham), которая выполняет случайное первичное мечение [³²P]дЦТФ.

Меченые зонды гибридизировали с целевой ДНК на нейлоновых мембранах для обнаружения специфических фрагментов с применением раствора для гибридизации MiracleHyb® Hybridization Solution по существу в соответствии с описанием производителя (Stratagene). Отмывки после гибридизации проводили в условиях высокой строгости. Блоты экспонировали на рентгеновской пленке при -80°C в течение одной или более временных точек для обнаружения гибридизирующихся фрагментов.

Так как сайты фермента *Hind* III внутри Т-ДНК были известны, для каждого из зондов были определены точные размеры ожидаемой полосы (табл. 4, фиг. 2). В отношении интактной копии Т-ДНК ожидается, что зонд *cyu1F* должен гибридизоваться с фрагментом из 3891 п.о. Ожидается, что зонды генов *cyu34Ab1*, *cyu35Ab1* и *pat* должны гибридизоваться с фрагментом из 7769 п.о. Фрагменты из тестируемых образцов, соответствующие ожидаемым размерам, а также соответствующие полосам в контрольном образце плазмиды, подтвердили бы целостность вставленной Т-ДНК и наличие каждого гена.

Результаты анализа методом Саузерн-блоттинга *Hind* III и генными зондами *cyu1F*, *cyu34Ab1*, *cyu35Ab1* и *pat* подтвердили ожидаемые размеры фрагментов и, таким образом, подтвердили, что Т-ДНК вставлена интактной в каждый из объектов, а также что в ней присутствует каждый из генов.

В случае зонда *cyu1F* наблюдалась полоса из приблизительно 4 т.п.о., что соответствовало ожидаемому размеру фрагмента. Аналогичный фрагмент из приблизительно 4 т.п.о. наблюдали в дорожке плазмидного положительного контроля, в которой, предположительно, находилась ожидаемая полоса из 3891 п.о. На основании эквивалентной миграции гибридизирующейся полосы в объектах в полосу в плазмидном положительном контроле было подтверждено, что часть Т-ДНК, содержащая *cyu1F*, была вставлена в маис 4114 интактной.

При гибридизации с зондом *cyu34Ab1* полоса из приблизительно 8 т.п.о. наблюдалась в объекте, а

также в плазмидном положительном контроле. Гибридирующая полоса на дорожке плазмидного положительного контроля, предположительно, представляла собой ожидаемую полосу из 7769 п.о. Так как гибридирующая полоса в объекте мигрировала эквивалентно данной полосе, было подтверждено, что данная часть Т-ДНК, содержащая *cry34Ab1*, была вставлена интактной.

Аналогичным образом, как и ожидалось, гибридизации *cry35Ab1* и *pat* с таким же фрагментом из 7769 п.о. происходили в растении и плазмидном положительном контроле. Данные результаты подтвердили, что часть Т-ДНК, содержащая гены *cry35Ab1* и *pat*, была вставлена интактной.

Данный анализ методом Саузерн-блоттинга подтверждает, что маис 4114 содержит интактную копию Т-ДНК из RHP27118, содержащую гены *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* и *pat*.

Таблица 4

Сводная информация по ожидаемым и наблюдаемым гибридизующимся фрагментам на Саузерн-блотах в случае ДНК маиса 4114, расщепляемой Hind III

Зонд	Ожидаемый размер фрагмента из Т-ДНК RHP27118 (п.о.) ¹	Наблюдаемый размер фрагмента (т.п.о.) ²
<i>cry1F</i>	3891	~4
<i>cry34Ab1</i>	7769	~8
<i>cry35Ab1</i>	7769	~8
<i>pat</i>	7769	~8

¹ Ожидаемые размеры фрагмента на карте Т-ДНК RHP27118 (фиг. 2).

² Все наблюдаемые фрагменты мигрировали эквивалентно плазмидному положительному контролю. Таким образом, было подтверждено, что они представляют собой интактную часть Т-ДНК RHP27118.

Число копий.

Для оценки числа копий вставок в маисе 4114 во время гибридизаций методом Саузерн-блоттинга применяли зонды *cry1F* и *pat*.

Для анализа числа копий методом Саузерн-блоттинга был выбран рестрикционный фермент Bcl I, так как внутри Т-ДНК размещен один сайт (фиг. 2). Приблизительно 3 мкг геномной ДНК из отдельных растений поколения T1 объекта 4114 подвергли расщеплению Bcl I и разделению по размеру на агарозном геле. Для получения положительного контроля гибридизации в образец ДНК контрольного растения вносили плазмиду, содержащую Т-ДНК RHP27118, проводили расщепление и наносили на агарозный гель. Также использовали отрицательный контроль ДНК маиса для проверки фоновой гибридизации зонда с геномом маиса. В качестве стандарта размера для гибридизирующихся фрагментов в блоты с Bcl I добавляли меченный дигоксигенином (DIG) маркер молекулярного веса DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана, США).

Зонды для генов *cry1F* и *pat* также метили во время ПЦР-реакции, включив во фрагмент меченный дигоксигенином (DIG) нуклеотид, [DIG-11]-дУТФ. Мечение выделенных фрагментов во время ПЦР проводили в соответствии с процедурами, поставляемыми в наборе PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche).

Меченные DIG зонды гибридизовали с Саузерн-блотах с Bcl I поколения T1 объекта 4114. Зонды гибридизовали с целевой ДНК для обнаружения специфических фрагментов с применением раствора DIG Easy Hyb (Roche), по существу, в соответствии с описанием производителя. Отмывки после гибридизации проводили в условиях высокой строгости. Меченные DIG зонды, гибридизовавшиеся со связанными фрагментами, были обнаружены с применением системы CDP-Star Chemiluminescent Nucleic Acid Detection System (Roche). Блоты экспонировали на рентгеновской пленке при комнатной температуре в течение одной или более временных точек для обнаружения гибридизирующихся фрагментов. До гибридизации с дополнительными зондами с мембран срезали гибридизованный зонд.

Для подтверждения наличия одной вставки Т-ДНК RHP27118 в маисе 4114 выбрали рестрикционный фермент Bcl I, имеющий один сайт рестрикции внутри Т-ДНК (фиг. 2). Сайт для Bcl I размещен на п.о. 2546 Т-ДНК (фиг. 2), что позволяет получить для одной вставленной Т-ДНК фрагменты более приблизительно 2500 п.о. и 9400 п.о. Гибридизация с зондом *pat* указывала бы на число копий данного элемента, находящегося в объекте, на основе числа гибридизирующихся полос (например, одна гибридизирующаяся полоса указывает на одну копию элемента). Зонд *pat* должен гибридизоваться с фрагментом более 9400 п.о. Так как сайт рестрикционного фермента Bcl I находится внутри гена *cry1F*, ожидается, что зонд *cry1F* будет гибридизоваться с обоими фрагментами и даст две полосы для одной вставки Т-ДНК (фиг. 2).

Сводная информация по результатам анализа методом Саузерн-блоттинга с Bcl I и генными зондами *cry1F* и *pat* для маиса 4114 представлена в табл. 5.

Таблица 5

Сводная информация по ожидаемым и наблюдаемым фрагментам гибридизации на Саузерн-блотах для расщепления Bcl I в маисе 4114

Зонд	Расщепление ферментом	Ожидаемый размер фрагмента из Т-ДНК РНР27118 (п.о.) ¹	Наблюдаемый размер фрагмента (т.п.о.) ²
<i>cry1F</i>	<i>Bcl</i> I	> 2500 ³ > 9400	~ 3,1 > 8,6
<i>pat</i>	<i>Bcl</i> I	> 9400	> 8,6

¹ Ожидаемые размеры фрагментов на основе карты Т-ДНК РНР27118 (фиг. 2).

² Все наблюдаемые размеры фрагмента аппроксимированы на основе миграции маркера молекулярного веса DIG VII.

³ В случае зонда *cry1F* вследствие того, что сайт рестрикции Bcl I расположен внутри гена *cry1F*, ожидаются два фрагмента.

Результаты анализа маиса 4114 методом Саузерн-блоттинга с расщеплением Bcl I и зондом *cry1F* показали, как и ожидалось, две полосы: одну полосу более 8,6 т.п.о. и вторую полосу приблизительно 3,1 т.п.о. Для одной вставки вследствие местоположения сайта Bcl I внутри гена *cry1F* ожидалось две полосы, так что данные результаты указывают на наличие одной копии *cry1F* в маисе 4114. Результаты анализа маиса 4114 методом Саузерн-блоттинга с расщеплением Bcl I и зондом *pat* показали одну полосу более 8,6 т.п.о., что, как и ожидалось, соответствовало размеру более крупной полосы *cry1F*. Данные результаты указывают то, что также присутствует одна вставка гена *pat* в объекте маиса 4114.

Так как гены *cry34Ab1* и *cry35Ab1* размещены на том же фрагменте, что и ген *pat* и часть гена *cry1F*, а также между генами *cry1F* и *pat* на Т-ДНК, удлинение также демонстрирует, что данный объект, вероятно, содержит одну копию каждого из данных генов.

Пример 4. Характеризация секвенирования вставки и пограничных геномных областей в объекте маиса DP-004114-3.

Последовательность вставки и пограничных геномных областей определяли для подтверждения целостности вставленной ДНК и для характеристики геномной последовательности, фланкирующей сайт вставки, присутствующий в маисе 4114.

В общем были подтверждены 16752 п.о. геномной последовательности маиса 4114, которые содержат 2422 п.о. 5'-пограничной геномной последовательности, 2405 п.о. 3'-пограничной геномной последовательности и 11925 п.о. вставленной Т-ДНК из РНР27118. Было обнаружено, что вставленная Т-ДНК в маисе 4114 имела делецию 29 п.о. на конце правой границы (ПГ) и делецию 24 п.о. на конце левой границы (ЛГ). Вся остальная последовательность является интактной и идентичной последовательности плазмиды РНР27118. С помощью ПЦР-амплификации и секвенирования пограничных геномных областей как маиса 4114, так и контрольных растений маиса было подтверждено, что 5'- и 3'-пограничные геномные области маиса 4114 происходили от маиса.

Семя, содержащее объект DP-004114-3, было получено от поколения T1S2 маиса 4114. Контрольное семя было получено от линии маиса, имеющей генетическое окружение, аналогичное генетическому окружению маиса 4114, но не содержащее генов *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* и *pat*. Все семена были получены от компании Pioneer Hi-Bred International, Inc. (г. Джонстон, штат Айова, США). Во время гель-электрофореза применяли Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Corp., г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и High DNA Mass Ladder (Invitrogen Corp.) для оценки размеров фрагмента ДНК на агарозных гелях.

Семя маиса 4114 и контрольное семя высаживали в камеры для проращивания на экспериментальной станции DuPont (г. Вилмингтон, штат Делавэр, США) и получали растительные ткани, применяемые в данном исследовании. Высаживали по одному семени в горшок, и каждый горшок уникальным образом идентифицировали. Все растения выращивали при освещении, температуре и поливе, отрегулированных для выращивания здорового растения. Собирали образцы листа от контрольных растений и растений маиса 4114. Для каждого отдельного растения листовой материал собирали в предварительно маркированный мешок, помещали на сухой лед, а затем переносили в сверхнизкотемпературный морозильник (<-55°C). Все образцы хранили замороженными до обработки ткани.

Подтверждение генотипа с помощью специфичного для объекта ПЦР-анализа.

Образец листа для специфичного для объекта ПЦР-анализа отбирали для всех тестируемых и контрольных растений. Из каждого образца листа экстрагировали ДНК с применением набора Extract-N-Amp™ Plant PCR в соответствии с описанной процедурой для анализа ПЦР в реальном времени (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, штат Миссури, США).

ПЦР в реальном времени выполняли для каждого образца ДНК, используя секвенатор ABI PRISM® 7500HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Inc., г. Фостер-Сити, штат Калифорния, США). Был разработан зонд TaqMan® (Applied Biosystems, Inc.) и наборы праймеров (Integrated DNA Technologies, г. Коралвилль, штат Айова, США) для обнаружения целевой последовательности из маиса 4114.

Кроме того, применяли второй зонд TaqMan® и набор праймеров для эталонного эндогенного гена маиса, чтобы подтвердить наличие амплифицируемой ДНК в каждой реакции. Анализ состоял из определения качественных положительных/отрицательных результатов с помощью ПЦР в реальном времени. Экстрагированную ДНК анализировали с применением мастер-микса TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Inc.).

Положительное или отрицательное определение для маиса 4114 было основано на сравнении СТ (порогового цикла) ПЦР, специфичной для объекта, цели и этого же значения эндогенной эталонной цели маиса. Если объект и эндогенные цели ПЦР амплифицировались выше порога СТ, то растение расценивалось положительным для данного объекта. Если эндогенная цель амплифицировалась, а объект не амплифицировался, то растение расценивалось отрицательным. Если в конкретном образце не амплифицировалась ни одна из целей, то было определено, что образец ДНК имеет низкое качество или имела место ошибка, и анализ повторяли.

Все растения маиса 4114 были положительными по специфичной для объекта ПЦР и по белкам PAT, Cry1F и Cry34Ab1, в то время как все контрольные растения маиса были отрицательными. Сводные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Сводная информация по специфичному для объекта ПЦР-анализу и экспрессии белков Cry1F, Cry34Ab1 и PAT в маисе 4114 и контрольных растениях маиса

Идентификатор растения маиса 4114	Специфичная для объекта ПЦР ¹	Cry1F ²	Cry34Ab1 ²	PAT ²
T-F-08-233C-1	+	+	+	+
T-F-08-233C-2	+	+	+	+
T-F-08-233C-3	+	+	+	+
T-F-08-233C-4	+	+	+	+
Идентификатор контрольного растения маиса				
C-F-08-246C-1	-	-	-	-
C-F-08-246C-2	-	-	-	-

¹ Сводная информация по специфичному для объекта ПЦР-анализу для маиса 4114.

Положительный результат (+) указывает на наличие объекта маиса 4114.

Отрицательный результат (-) указывает на отсутствие объекта маиса 4114.

² Сводная информация по экспрессии белков Cry1F, Cry34Ab1 и PAT в маисе 4114 и контрольных растениях маиса с применением ИФА на тест-полосках. Положительный результат (+) указывает на наличие белка. Отрицательный результат (-) указывает на отсутствие белка.

Секвенирование ДНК.

Фрагменты ДНК клонировали и представили для секвенирования в лабораторию по секвенированию Pioneer Crop Genetics Research (г. Вилмингтон, штат Делавэр, США). Для сборки последовательностей применялось программное обеспечение Sequencher™ от компании Gene Codes Corporation (г. Энн-Арбор, штат Мичиган, США). Аннотацию последовательности выполняли с применением Vector NTI 9.1.0 (Invitrogen Corp), сравнивая последовательности вставки Т-ДНК, полученные из маиса 4114, с последовательностями из области Т-ДНК плазмиды РНР27118 (применяемой для трансформации с получением маиса 4114).

Область Т-ДНК плазмиды РНР27118, применяемую для создания маиса 4114, секвенировали и сравнивали со вставленной последовательностью Т-ДНК в маисе 4114.

Последовательность области Т-ДНК плазмиды РНР27118 применяли для создания пар праймеров с целью характеристики вставленной Т-ДНК в маисе 4114. С применением в качестве матрицы геномной ДНК из четырех разных растений маиса 4114 были получены шесть перекрывающихся продуктов ПЦР. Данные продукты ПЦР клонировали и секвенировали.

Секвенирование 5'- и 3'-фланкирующих пограничных геномных областей.

Предварительную характеристику последовательностей 5'- и 3'-фланкирующих пограничных геномных областей проводили с применением нескольких циклов обратной ПЦР (Silver and Keerikatte (1989 г.) J. Virol. 63:1924; Ochman et al. (1988 г.) Genetics 120:621-623; Triglia et al., (1988 г.) Nucl. Acids Res. 16:8186) с праймерами, зафиксированными внутри различных областей вставленной Т-ДНК. Информацию о последовательности, полученной в результате обратной ПЦР, подвергли анализу BLASTn, который показал совпадение с ВАС-клоном маиса AC211214 по нуклеотидной базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) GenBank. Затем данную последовательность применяли для разработки праймеров, охватывающих 5'- и 3'-концевые соединения вставки/геномные со-

единения в маисе 4114. Продукты ПЦР, полученные из четырех растений маиса 4114, клонировали и секвенировали для проверки 5'- и 3'-концевых соединений вставок/геномных соединений и пограничных геномных областей.

Кроме того, для демонстрации того, что идентифицированные 5'- и 3'-пограничные геномные области имели происхождение от маиса, провели ПЦР находящихся внутри геномных областей в маисе 4114 и в контрольных растениях маиса. Каждый ПЦР-фрагмент непосредственно секвенировали, чтобы проверить его идентичность происхождению от маиса.

Для создания праймеров для проверки вставленной последовательности в маисе 4114 применяли информацию о последовательности Т-ДНК плазмиды РНР27118 (табл. 7 и 8).

Таблица 7

ПЦР-праймеры, применяемые для характеристики пограничных геномных областей, и вставленная Т-ДНК в маисе 4114

ПЦР-фрагмент	Пара праймеров	SEQ ID NO праймеров:	Размер (п.о.)	Аmplицированная область
A	09-0-3030/ 09-0-2787	11/12	2511	5'-пограничная геномная область и вставка
B	09-0-3036/ 09-0-3046	13/14	3622	Вставка
C	09-0-2980/ 09-0-3045	16/15	4146	Вставка
D	08-0-2463/ 08-0-2759	17/18	2713	Вставка
E	09-0-2775/ 09-0-3083	19/20	3062	Вставка
F	09-0-2799/ 09-0-3005	21/22	2612	3'-пограничная геномная область и вставка
G	09-0-3230/ 09-0-3229	23/24	257	5'-пограничная геномная область
H	09-0-3231/ 09-0-3084	25/26	283	3'-пограничная геномная область

Таблица 8

Последовательность и местоположение праймеров, применяемых в ПЦР-реакциях

ПЦР-фрагмент	Праймер (SEQ ID NO:)	Праймерная последовательность (5'–3')	Местоположение целевой последовательности (п.о.–п.о.) ¹
A	09-0-3030 (SID: 11)	GAGCATATCCAGCACCAGCTGGT ACCAAG	1–29
	09-0-2787 (SID: 12)	GCAGGCATGCCCCGCGGATA	2,511–2,493
B	09-0-3036 (SID: 13)	TGGTCTACCCGATGATGTGATTG GCC	1,994–2,019
	09-0-3046 (SID: 14)	CGAAGACAGGATCTGACAAGGTC CGATAG	5,615–5,587
C	09-0-3045 (SID: 15)	GACTTCATGAACTCTTTGTTTGTG ACTGCAGAGAC	5,414–5,414
	09-0-2980 (SID: 16)	CTCATGACTCAGGACTTGTGGC	9,559–9,538
D	08-0-2463 (SID: 17)	ATCAGCCTCTACTTCGAC	9,390–9,407
	08-0-2759 (SID: 18)	CTCCATGATCTTCGTCTCATGTG	12,102–12,080
E	09-0-2775 (SID: 19)	CACCAACTCCATCCAGAAGTGGC	11,481–11,503
	09-0-3083 (SID: 20)	GCCTTGCAATTGGCGCAGTGAGAA CCG	14,542–14,517
F	09-0-2799 (SID: 21)	CGGCGCGCCTCTAGTTGAAGAC ACGTT	14,141–14,167
	09-0-3005 (SID: 22)	CACTGGACTGAGCCGCACAGCT AAGGACAC	16,752–16,723
G	09-0-3230 (SID: 23)	GGAACATTGAGCTTGGGAGTCT GGACT	2,086–2,113
	09-0-3229 (SID: 24)	GAACAGGGTCCTCGAATCAAGG GCAGC	2,342–2,316
H	09-0-3231 (SID: 25)	CGGTTCTCACTGCGCCAATGCAA GGC	14,517–14,542
	09-0-3084 (SID: 26)	CATGACGACCATGAAGCAACATC	14,799–14,777

¹ Местоположение в последовательности маиса 4114.

Основания 1-2422 = 5'-пограничная геномная область.

Основания 2423-14347 = вставка.

Основания 14348-16752 = 3'-пограничная геномная область.

Для характеристики вставленной Т-ДНК в маисе 4114 были выполнены ПЦР-праймеры с возможностью амплификации вставки Т-ДНК в шести отдельных перекрывающихся продуктах ПЦР, как кратко представлено в табл. 7, фрагменты А-Ф (положения указаны на фиг. 5). Как и ожидалось, спрогнозированные продукты ПЦР были получены только из образцов геномной ДНК в маисе 4114, а в контрольных образцах маиса они отсутствовали. Шесть продуктов ПЦР клонировали и секвенировали. При сравнении последовательности вставленной Т-ДНК в маисе 4114 с областью Т-ДНК плазмиды РНР27118, которую применяли для создания маиса 4114, было определено наличие делеции 29 п.о. на ПГ-конце и делеции 24 п.о. на ЛГ-конце. Делеции на ПГ- и ЛГ-конце часто возникают при трансформации, опосредованной *Agrobacterium* (Kim et al. (2007 г.) Plant J. 51:779-791). Вся остальная последовательность является интактной и идентичной последовательности плазмиды РНР27118. Последовательность вставки представлена в SEQ ID NO: 27.

Для проверки дополнительной 5'-пограничной геномной последовательности выполняли ПЦР с прямым праймером (SEQ ID NO: 11) на 5'-пограничной геномной области и обратным праймером (SEQ ID NO: 12) внутри вставленной Т-ДНК. Полученный ПЦР-фрагмент А из 2511 п.о. из образцов геномной ДНК маиса 4114 клонировали и секвенировали (фиг. 3). 2422 п.о. из последовательности 5'-пограничной геномной области представлены в нуклеотидах 1-2422 SEQ ID NO: 27.

Для проверки дополнительной 3'-пограничной геномной последовательности выполняли ПЦР с прямым праймером (SEQ ID NO: 21) внутри вставленной Т-ДНК и обратным праймером (SEQ ID NO: 22) в 3'-пограничной геномной области. Полученный ПЦР-фрагмент F из 2612 п.о. из образцов геномной ДНК маиса 4114 клонировали и секвенировали (фиг. 3). 2405 п.о. из последовательности 3'-пограничной геномной области представлены в нуклеотидах 14 348-16 752 SEQ ID NO: 27.

В общем были подтверждены 16752 п.о. последовательности из геномной ДНК маиса 4114: 2422 п.о. 5'-пограничной геномной последовательности, 2405 п.о. 3'-пограничной геномной последовательности и 11925 п.о., содержащих вставленную Т-ДНК.

Для демонстрации происхождения от маиса идентифицированных 5'- и 3'-фланкирующих пограничных геномных последовательностей выполнили ПЦР внутри 5'- и 3'-пограничных геномных областей (пара праймеров представлена в SEQ ID NO: 23 и 24 и пара праймеров представлена в SEQ ID NO: 25 и 26 соответственно) геномной ДНК маиса 4114 и контрольных образцов маиса. Как в случае маиса 4114, так и в случае контрольного маиса были получены ожидаемый ПЦР-фрагмент G (257 п.о. для 5'-геномной области) и ПЦР-фрагмент H (283 п.о. для 3'-геномной области). Данные продукты ПЦР клонировали и секвенировали и соответствующие продукты из маиса 4114 и контрольного маиса идентичны, и это подтверждает, что последовательности имеют происхождение от маиса.

Пример 5. Эффективность объекта маиса DP-004114-3 в отношении насекомых.

Для маиса 4114 были получены данные по эффективности. В полевом испытании сравнивали маис 4114 в двух генетических окружениях с отрицательным контролем (изолиния) в тех же окружениях. Испытание на эффективность включало повреждение листьев первым поколением ECB (ECB1) и повреждение стеблей вторым поколением ECB (ECB2) в четырех местоположениях, повреждение корней WCRW в трех местоположениях и повреждение листьев FAW в одном местоположении. В каждом местоположении были высажены делянки по одному ряду в рандомизированном полном блоке в трех повторностях (20 ядер/делянка × 12 групп × 3 повторности = 1 эксперимент/местоположение). У всех растений после прорастания отбирали образцы ткани для подтверждения наличия объекта с помощью специфичной для объекта ПЦР. Все отрицательные образцы отбраковывали и каждую делянку прореживали до целевой плотности посадки 10-15 равномерно распределенных растений на делянку.

Для исследований, в которых выполняют характеристику повреждения ECB1, каждое растение вручную заражали приблизительно сотней новорожденных личинок ECB 3 раза (в общем 300 личинок) в течение приблизительно одной недели, начиная приблизительно со стадии роста V5. Приблизительно через три недели после последнего успешного заражения определяли оценку повреждения листьев (на основе визуальной шкалы 9-1, где 9 указывает на отсутствие повреждений, а 1 указывает на максимальное повреждение) на 8 последовательных растениях на делянку (в общем 24 растения на генетическое окружение на группу) и вычисляли средние значения для каждой обработки. Результаты поедания первым поколением ECB листьев маиса 4114 показаны в табл. 9.

Таблица 9

Эффективность маиса DP-004114-3 в отношении первого поколения личинок ECB

Местоположение	Линия маиса	Средняя оценка повреждений ECB1LF $\pm$ Стандартная ошибка ^{a,b}
г. Йорк, штат Небраска	4114	9,0 $\pm$ 0,05 A
	1507x59122	9,0 $\pm$ 0,08 A
	Отрицательный контроль	4,4 $\pm$ 0,09 B
г. Джонстон, штат Айова	4114	9,0 $\pm$ 0,00 A
	1507x59122	9,0 $\pm$ 0,00 A
	Отрицательный контроль	4,5 $\pm$ 0,08 B
г. Манкато, штат Миннесота	4114	9,0 $\pm$ 0,02 A
	1507x59122	9,0 $\pm$ 0,03 A
	Отрицательный контроль	4,7 $\pm$ 0,11 B
г. Принстон, штат Иллинойс	4114	9,0 $\pm$ 0,00 A
	1507x59122	9,0 $\pm$ 0,00 A
	Отрицательный контроль	5,5 $\pm$ 0,17 B

^a Оценки повреждения отдельных растений определяли с применением следующей шкалы визуальной оценки:

9. Отсутствуют видимые повреждения листьев или небольшое количество небольших проколов или повреждений типа тонких червоточин на нескольких листьях.
8. Небольшое количество поражений в виде тонких червоточин на нескольких листьях.
7. Общие для нескольких листьев повреждения в виде червоточин.
6. Несколько листьев с червоточинами и удлиненными поражениями (поражения <1,27 см (<0,5") в длину).
5. Несколько листьев с удлиненными поражениями (поражения 1,27-2,54 см (0,5"-1,0") в длину).
4. Несколько листьев с удлиненными поражениями (поражения >2,54 см (>1,0") в длину).
3. Длинные поражения >2,54 см (>1,0"), общие на приблизительно половине листьев.
2. Длинные поражения >2,54 см (>1,0"), общие на приблизительно двух третях листьев.
1. Большинство листьев имеет длинные поражения.

^b В пределах местоположения средние значения, обозначенные той же буквой, не являются в значительной степени различными (критерий Фишера с наименьшей значимой разностью, $P > 0,05$).

Для исследований, в которых выполняют характеризацию повреждения, вызванного ECB2, те же растения, которые ранее заражали ECB1, на более поздней стадии сезона роста снова заражали вручную приблизительно сотней новорожденных личинок ECB на растение (в общем 300 личинок) 3 раза в течение приблизительно одной недели, начиная от стадии роста R1, когда пыльцу сбрасывали приблизительно 50% растений. Приблизительно через 50-60 дней после последнего заражения отделяли стебли 8 последовательных растений на делянке (в общем 24 растения на генетическое окружение на группу) от верхней части 4-го междоузлия над первичным початком и до основания растения. Затем измеряли общую длину ходов ECB в стебле (ECBXCM) в сантиметрах и регистрировали для каждого растения. Ходы 1 см или менее считались входными отверстиями (личинка не смогла внедриться в стебель) и были исключены из общей длины ходов в см. Для каждой обработки вычисляли средние значения (общая длина ходов в см). Результаты поедания личинками ECB2 стебля маиса 4114 показаны в табл. 10.

Таблица 10

Эффективность маиса DP-004114-3 в отношении второго поколения личинок ECB

Местоположение	Линия маиса	Среднее значение ECBХСМ (длина хода, см) ± Стандартная ошибка ^b
г. Йорк, штат Небраска	4114	0,9 ± 0,27 В
	1507х59122	0,4 ± 0,12 В
	Отрицательный контроль	22,6 ± 1,83 А
г. Манкато, штат Миннесота	4114	1,3 ± 0,30 В
	1507х59122	0,7 ± 0,18 В
	Отрицательный контроль	31,3 ± 2,19 А
г. Джонстон, штат Айова	4114	1,1 ± 0,26 В
	1507х59122	0,3 ± 0,11 В
	Отрицательный контроль	33,0 ± 2,51 А
г. Принстон, штат Иллинойс	4114	0,8 ± 0,22 В
	1507х59122	0,1 ± 0,07 В
	Отрицательный контроль	10,0 ± 0,94 А

^b В пределах местоположения средние значения, обозначенные той же буквой, не являются в значительной степени различными (критерий Фишера с наименьшей значимой разностью, $P > 0,05$).

Также исследовали повреждение корня, вызванное WCRW. Растения, находящиеся приблизительно на стадии роста V2, вручную заражали приблизительно 500 яйцами WCRW, вносимыми в почву с каждой стороны растения (в общем ~1000 яиц/растение). Кроме того, делянки высаживали в полях, имеющих высокую вероятность наличия естественного заражения WCRW. Корни растения оценивали приблизительно на стадии роста R2. С делянки удаляли по пять последовательных растений на делянке (в общем 45 растений на генетическое окружение на группу) и промывали водой под давлением. Повреждение корня оценивали с применением шкалы узловых повреждений от 0 до 3 (CRWNIS) (Oleson, et al. (2005 г.) J. Econ. Entomol. 98(1): 1-8) и вычисляли средние значения для каждой обработки. Средние оценки повреждения корня в результате поедания WCRW показаны в табл. 11.

Таблица 11

Эффективность маиса DP-004114-3 в отношении личинок WCR

Местоположение	Линия маиса	Средний балл CRWNIS ± Стандартная ошибка ^{b,c}
г. Джонстон, штат Айова	4114	0,1 ± 0,01 В
	1507х59122	0,1 ± 0,02 В
	Отрицательный контроль	0,5 ± 0,09 А
г. Манкато, штат Миннесота	4114	0,1 ± 0,02 В
	1507х59122	0,1 ± 0,01 В
	Отрицательный контроль	1,1 ± 0,11 А
г. Рошель, штат Иллинойс	4114	0,3 ± 0,04 В
	1507х59122	0,1 ± 0,01 В
	Отрицательный контроль	1,3 ± 0,18 А

^b Оценки повреждения корневых масс отдельных растений определяли с применением шкалы узловых повреждений от 0 до 3 (Oleson et al. 2005 г., выше).

^c В пределах местоположения средние значения, обозначенные той же буквой, не являются в значительной степени различными (критерий Фишера с наименьшей значимой разностью, $P > 0,05$).

Для испытания на эффективность в отношении FAW отдельные растения вручную заражали приблизительно на стадии роста V5, используя приблизительно 75 новорожденных личинок. Оценивали повреждение листьев 8 последовательных растений на делянку (в общем 24 растения на генетическое окружение на группу) (FAWLF на основе визуальной шкалы оценки от 9 до 1, где 9 указывает на отсутствие повреждения, а 1 указывает на максимальное повреждение приблизительно через две недели после последней успешной инокуляции) и вычисляли средние значения для каждой обработки. Средние оценки повреждения, характеризующие поедание FAW листья DP-004114-3 показаны в табл. 12.

Эффективность маиса DP-004114-3 в отношении личинок FAW

Местоположение	Линия маиса	Средняя оценка повреждения FAWLF ± Стандартная ошибка ^{a,b}
г. Джонстон, штат Айова	4114	8,9 ± 0,06 BC
	1507x59122	9,0 ± 0,00 A
	Отрицательный контроль	2,1 ± 0,08 D

^a Оценки повреждения отдельных растений определяли с применением следующей шкалы визуальной оценки:

9. Нет повреждения или булавочные поражения на мутовках листьев.

8. Булавочные отверстия или небольшие круглые поражения присутствуют на мутовках листьев.

7. Небольшие круглые поражения и несколько небольших удлиненных поражений (прямоугольной формы) длиной до 1,27 см (0,5") присутствуют на мутовчатых и свернутых листьях.

6. Несколько небольших удлиненных поражений длиной от 1,27 см до 2,54 см (от 0,5" до 1") на нескольких мутовчатых и свернутых листьях.

5. Несколько крупных удлиненных поражений длиной более 2,54 см (1"), присутствующих на нескольких мутовчатых и свернутых листьях, и/или несколько отверстий от небольшого до среднего размера и от правильной до неправильной формы отверстий (объедена базальная мембрана) на мутовчатых и свернутых листьях.

4. Несколько крупных удлиненных поражений, присутствующих на нескольких мутовчатых и свернутых листьях, и/или несколько крупных отверстий от правильной до неправильной формы отверстий на мутовчатых и свернутых листьях.

3. Множество удлиненных поражений всех размеров, присутствующих на нескольких мутовчатых листьях, плюс несколько крупных отверстий от правильной до неправильной формы отверстий на мутовчатых и свернутых листьях.

2. Множество удлиненных поражений всех размеров, присутствующих на большинстве мутовчатых и свернутых листьев, плюс множество отверстий от среднего до крупного размера и от правильной до неправильной формы отверстий на мутовчатых и свернутых листьях.

1. Мутовчатые и свернутые листья практически полностью уничтожены.

^b В пределах местоположения средние значения, обозначенные той же буквой, не являются в значительной степени различными (критерий Фишера с наименьшей значимой разностью, $P > 0,05$).

Помимо полевых исследований эффективности маиса 4114 оценивали в лабораторном сублетальном анализе с проростками (SSA) (патентная публикация США № 2006/0104904, содержимое которой включено в настоящий документ путем ссылки). SSA позволял выполнить сравнение эффективности маиса 4114 и незащищенного контроля (близкого к изолинейному) без искажающих воздействий полевых условий. В технике SSA популяцию новорожденных WCRW подвергают воздействию проростков маиса, содержащих либо один из объектов маиса 4114, либо нетрансгенные проростки маиса (отрицательный контроль). Личинки подвергали воздействию в течение периода 17 дней от даты начального выведения из яиц. Экспериментальный модуль для SSA представлял собой один пластиковый контейнер с размерами 23×30×10 см (Pactiv Corp., г. Лейк-Форест, штат Иллинойс, США). Группы располагали в полном рандомизированном блоке по 3 повторности на группу. В каждой группе установка SSA включала размещение 115 ядер в каждый контейнер с 225 мл 1%-го фунгицидного раствора тиюфанат-метила и 1000 мл среды для роста растения Metro-Mix 200 (Scotts-Sierra Horticultural Products Company, г. Мэрисвилль, штат Огайо, США). Непосредственно после добавления Metro-Mix яйца WCRW наносили на поверхность каждого контейнера в количестве 1000 яиц на контейнер. Яйца WCRW предварительно инкубировали при 25°C так, чтобы начальное выведение из яиц происходило через 5-7 дней после установки контейнера. Зараженные контейнеры удерживали в камере с окружающей средой с возможностью входа и со следующими параметрами: температура 25°C, относительная влажность 65% и цикл свет:темнота 14:10. Личинки экстрагировали из контейнеров через 17 дней после выведения из яиц с применением системы с воронкой Берлезе. Отбирали случайную часть выборки из 30 личинок на контейнер, измеряли их головные капсулы под препаровальной лупой и классифицировали каждую на 1 из 3 личиночных стадий. Собирали данные, включающие возрастную структуру популяции личинок, которую определяли на основе числа личинок в каждой из трех потенциальных личиночных стадий. Строили гистограммы, которые графически показывали возрастное распределение личинок в каждой группе, и визуально сравнивали их, как показано на фиг. 4.

Спектр вредителей маиса 4114 представлен в табл. 13.

Таблица 13

Насекомые-вредители, численность которых контролируется или подавляется маисом DP-004114-3, экспрессирующим Cry1F, Cry34Ab1 и Cry35Ab1

Научное название	Обычное название	Отряд насекомых
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Огневка кукурузная (European corn borer, ECB)	Чешуекрылые
<i>Helicoverpa zea</i>	Совка хлопковая (Corn earworm, CEW)	Чешуекрылые
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Совка травяная (Fall armyworm, FAW)	Чешуекрылые
<i>Diatraea grandiosella</i>	Огневка кукурузная юго-западная (Southwestern corn borer, SWCB)	Чешуекрылые
<i>Richia albicosta</i>	Совка бобовая западная (WBCW)	Чешуекрылые
<i>Agrotis ipsilon</i>	Совка-ипсилон (Black cutworm, BCW)	Чешуекрылые
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Личинка огневки (Lesser corn stalk borer, LCSB)	Чешуекрылые
<i>Diatraea crambidoides</i>	Огневка кукурузная стеблевая (Southern corn stalk borer, SCSB)	Чешуекрылые
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Западный кукурузный жук (WCRW)	Жесткокрылые
<i>Diabrotica virgifera zeae</i>	Западный кукурузный корневой жук (MCR)	Жесткокрылые
<i>Diabrotica berberi</i>	Блошка длинноусая (NCR)	Жесткокрылые
<i>Diatraea saccharalis</i>	Огневка сахарного тростника (SCB)	Жесткокрылые

Пример 6. Экспрессия и концентрация белка.

Получение растительного материала.

Маис 4114 из поколения PHNAR × BC3F3 выращивали в пяти местоположениях в Соединенных Штатах Америки и Канаде. В каждом месте использовали рандомизированную полноблочную схему, содержащую четыре блока, причем каждый блок разделен буферным расстоянием по меньшей мере 0,9 м (36 дюймов). Каждую группу высаживали на 2-рядные делянки, с каждой стороны ограниченные 1 рядом пограничных семян.

Сбор и обработка листовой ткани.

В каждом блоке на стадии V9 отбирали один образец листовой ткани. Все образцы были собраны от беспристрастно выбранных здоровых и репрезентативных для каждого объекта растений. Каждый образец листа получали путем выбора наиболее молодого листа, выступающего из мутовки по меньшей мере на 20 см (8 дюймов видимой ткани). Если данный лист был поврежден или имел другие признаки нездоровья, отбирали образец следующего листа, расположенного под ним. Лист подрезали (отрезали) от растения приблизительно на 20 см (8 дюймов) от кончика листа. Образец листа (включая центральную жилку) нарезали на куски по 2,5 см (<1 дюйма) и помещали во флакон для образца объемом 50 мл. Затем образцы помещали на сухой лед до переноса в морозильник ($\leq -10^{\circ}\text{C}$). Образцы транспортировали замороженными и хранили после прибытия при температуре $\leq -10^{\circ}\text{C}$. Все образцы ткани лиофилизировали под вакуумом до сухого состояния. При подготовке к анализу лиофилизированные образцы листа тонко гомогенизировали. Между этапами обработки образцы хранили замороженными.

Определения концентрации белка.

Концентрации белков Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 и PAT определяли с применением специфических количественных способов иммуноферментного анализа (ИФА).

Экстракция белка.

Аликвоты обработанных образцов листовой ткани взвешивали в пробирках объемом 1,2 мл при целевом весе 10 мг. Каждый образец, проанализированный на концентрации белков Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 и PAT, экстрагировали в 0,6 мл охлажденного PBST (фосфатно-солевой буфер плюс Tween-20). После центрифугирования супернатанты извлекали, разбавляли и анализировали.

Определение концентрации белков Cry1F, Cry34Ab1 и PAT.

Использованные наборы для ИФА на Cry1F, Cry34Ab1 и PAT были получены в компании EnviroLogix, Inc. (г. Портленд, штат Мэн, США), а использованный набор для ИФА на Cry35Ab1 был получен в компании Acadia BioScience, LLC (г. Портленд, штат Мэн, США). В способе ИФА для каждого из данных четырех белков использовали последовательную структуру типа "сэндвич" для определения концентрации белка в экстрактах образцов. Стандарты (анализируемые в лунках в трех повторностях) и разведенные экстракты образцов (анализируемые в лунках в двух повторностях) инкубировали на планшете, предварительно покрытой антителом, специфичным для одного белка, выбранного из Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 или PAT. После инкубации несвязанные вещества отмывали с планшеты. На планшет добавляли другие антитела, специфичные для соответствующего выбранного белка, конъюгированного с фер-

ментом пероксидазы хрена (HRP), и инкубировали. Затем несвязанные вещества отмывали с планшеты, на которой оставался белок, связанный в "сэндвиче" между антителом, нанесенным на планшету, и конъюгатом антитело-HRP. Обнаружение связанного комплекса антитело-белок обеспечивали путем добавления субстрата, позволяющего получить окрашенный продукт при наличии HRP. Реакцию останавливали с помощью раствора кислоты и с применением спектрофотометра для прочтения планшет определяли оптическую плотность (OD) каждой лунки. Среднее по результатам повторных лунок применяли для определения концентрации белка Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 или PAT в нг/мг сухого веса образца.

Расчеты для определения концентраций белков.

Для расчетов, необходимых для преобразования значений OD, полученных с помощью спектрофотометра для прочтения планшет, в концентрации белка применяли программное обеспечение SoftMax® Pro.

1. Стандартная кривая.

Стандартную кривую строили для каждой планшеты для ИФА. Программное обеспечение генерировало уравнение для стандартной кривой, в котором для соотношения средних значений OD, полученных для стандартов, с соответствующей стандартной концентрацией (нг/мл) применяли квадратичную аппроксимацию. Уравнение квадратичной регрессии применяли следующим образом:

$$y = Cx^2 + Bx + A$$

где x = известная стандартная концентрация, а y = соответствующее среднее значение поглощения (OD).

2. Концентрация образца.

Интерполяцию концентрации образца (нг/мл) проводили путем вычисления x по вышеуказанному уравнению с применением значений A, B и C, определенных по стандартной кривой.

$$\text{Концентрация образца (нг/мл)} = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4C(A - OD \text{ образца})}}{2C}$$

Например, параметры кривой A = 0,0476, B = 0,4556, C = -0,01910 и OD образца = 1,438.

$$\text{Концентрация образца} = \frac{-0,4556 + \sqrt{0,4556^2 - 4(-0,01910)(0,0476 - 1,438)}}{2(-0,01910)} = 3,6 \text{ нг/мл}$$

Значения концентрации образца были скорректированы на фактор разведения, выраженный как 1:N.

Скорректированная концентрация = концентрация образца × фактор разведения.

Например, концентрация образца = 3,6 нг/мл и фактор разведения = 1:10.

Скорректированная концентрация = 3,6 нг/мл × 10 = 36 нг/мл.

Скорректированные значения концентрации образца были преобразованы из нг/мл в нг/мг веса образца следующим образом:

нг/мг веса образца = нг/мл × объем при экстракции (мл)/вес образца (мг).

Например, концентрация = 36 нг/мл, объем при экстракции = 0,60 мл и вес образца = 10,0 мг,

нг/мг веса образца = 36 нг/мл × 0,60 мл/10,0 мг = 2,2 нг/мг.

3. Нижний предел количественного определения (LLOQ).

Значение LLOQ в нг/мг веса образца рассчитывали следующим образом:

$$\text{LLOQ} = \frac{\text{Фиксируемый LLOQ анализа} \times \text{объем при экстракции}}{\text{Целевой вес образца}}$$

Например, для PAT в листе фиксируемый LLOQ анализа = 2,3 нг/мл, объем при экстракции = 0,6 мл и целевой вес образца = 10 мг

$$\text{LLOQ} = \frac{2,3 \text{ нг/мл} \times 0,6 \text{ мл}}{10 \text{ мг}} = 0,14 \text{ нг/мг вес образца}$$

Результаты.

Белки Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 и PAT обнаруживали в листовой ткани маиса 4114 на стадии V9, и концентрации представлены в табл. 14 ниже.

Таблица 14

Концентрации белка в маисе 4114				
Концентрация белка в нг/мг сухого веса*				
	Cry1F	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT
Среднее ± СО	9,7 ± 2,5	26 ± 3,1	33 ± 3,1	9,8 ± 3,3
Диапазон	5,3 – 14	22 – 31	28 – 39	4,8 – 15

* LLOQ для Cry1F и PAT составили 0,14 нг/мг сухого веса;

LLOQ для Cry34Ab1 и Cry35Ab1 составили 0,16 нг/мг сухого веса.

Пример 7. Специфичная для объекта система идентификации для маиса DP-004114-3.

Специфичная для объекта система для маиса DP-004114-3 была разработана для 5'-концевого со-

единения между вставкой DP-004114-3 и геномной областью маиса. Прямой праймер (08-O-2677, SEQ ID NO: 29) расположен внутри геномной ДНК маиса, обратный праймер (08-O-2678, SEQ ID NO: 30) расположен внутри вставленной ДНК, а сайт связывания зонда (08-QP74, SEQ ID NO: 31) охватывает переход между вставкой DP-004114-3 и геномной ДНК маиса (табл. 15). Оптимальные концентрации праймера и зонда выбирали на основе эффективности ПЦР и возможности количественной оценки на нижнем (0,08% GM) и верхнем (5% GM) концах динамического диапазона (табл. 16).

Таблица 15

Праймеры и зонд для ПЦР-системы, специфичной для объекта DP-004114-3

Название	Последовательность	SEQ ID NO.
08-O-2677	5'- CGT TTG TAG CAC TTG CAC GTA GT -3'	29
08-O-2678	5'- GGT AAC CGC TCT TCC AGT TGA A -3'	30
08-QP74 (зонд)	5'- AAG CTT CAA CAC AGA TC -3'	31

Последовательность ампликона DP-004114-3 (подчеркнуты сайты связывания праймера и зонда):
длина: 90 п.о.

CGTTTGTAGCACTTGCACGTAGTTACCCGGACCGAAGCTTCAACACAGATCTGATAGT
TAAACGCTCTTCAACTGGAAGAGCGGTTACC (SEQ ID NO: 32)

Таблица 16

Мастер-микс для ПЦР-системы, специфичной для объекта DP-004114-3

Химические вещества	Концентрация	Итоговая концентрация†	мкл/реакционная смесь
Applied Biosystems TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	2 x	1 x	10.0
08-O-2677	10 мкМ	500 нМ	1,0
08-O-2678	10 мкМ	900 нМ	1,8
08-QP74	10 мкМ	200 нМ	0,4
Стерильная вода			1,8
Общий объем			15,0

† Общий объем ПЦР-реакции составляет 20 мкл (15 мкл мастер-микса и 5 мкл матрицы геномной ДНК).

Таблица 17

Параметры реакции и циклов	
Формат:	15 мкл мастер-микса + 5 мкл матрицы геномной ДНК = 20 мкл на реакцию
Оборудование:	Термоциклер реального времени Applied Biosystems ViiA7
Программное обеспечение:	Программное обеспечение ViiA 7 RUO версии 1.1
Лабораторная пластиковая посуда:	96-луночные реакционные оптические планшеты MicroAmp® (Applied Biosystems, Inc.); 384-луночные прозрачные реакционные оптические планшеты PRISM™ (Applied Biosystems, Inc.); и оптическая адгезивная пленка MicroAmp™ (Applied Biosystems, Inc.)

Таблица 18

Параметры циклов

Этап	Стадия	Темп.	Время	Сбор данных	Число циклов
	Начальная активация фермента		600 с	Нет	1x
	Амплификация	Денатурация	15 с	Нет	40x
	Отжиг и элонгация		60 с	Да	

В структуре анализа применяли стандартную кривую, имеющую четыре стандартные точки, каждая в трех повторностях. Стандарты получали путем приготовления раствора 40 нг/мкл общей геномной ДНК маиса с 10% ДНК маиса DP-004114-3 с последующими последовательными разведениями в буфере 0,1× TE, содержащем 10 нг/мкл ДНК молок лосося. Отрицательные контроли (NTC) измеряли для каждой системы в трех повторностях для проверки чистоты реагентов. Каждый образец (неизвестный) анализировали с 200 нг геномной ДНК маиса на реакцию в трех повторностях (в общем шесть реакций на образец в обеих ПЦР-системах). Впоследствии относительное содержание маиса DP-004114-3 к общей ДНК маиса вычисляли путем определения среднего числа копий на основе стандартных кривых (линейная регрессия значения порогового числа циклов (C_T) в зависимости от логарифма [числа копий]) и вычисляли отношения числа копий объекта маиса DP-004114-3 к общему числу копий гаплоидных геномов маиса.

Данная специфичная для объекта количественная ПЦР-система для обнаружения ДНК маиса DP-004114-3 была разработана, оптимизирована и валидирована на системе ПЦР в реальном времени Ар-

plied Biosystem's ViiA 7™. Однако способ может применяться на другой платформе с минимальной оптимизацией и адаптацией.

Описанный в настоящем документе специфичный для объекта способ ПЦР в реальном времени можно применять для определения относительного содержания ДНК маиса DP-004114-3 в общей геномной ДНК маиса. Способ выполняется линейным образом с приемлемым уровнем погрешности и точности во всем диапазоне содержания DP-004114-3 от 0,08 до 5,0%. Способ был разработан и валидирован с геномной ДНК, экстрагированной из семян маиса. Однако анализ можно применять для любой матрицы, из которой можно очистить геномную ДНК в достаточном количестве и с достаточным качеством.

Пример 8. Способ обнаружения объекта маиса DP-004114-3 на основе геля с помощью ПЦР.

В данном протоколе описан качественный ПЦР-анализ на основе геля для обнаружения наличия ДНК маиса DP-004114-3. Способ обнаружения с помощью ПЦР применяют в связи со способом экстракции ДНК, позволяющим получить ДНК с достаточным качеством и в достаточном количестве.

ПЦР-система для маиса DP-004114-3 была разработана с применением праймеров для амплификации 5'-пограничного соединения между геномной ДНК маиса и вставкой DP-004114-3. Прямой праймер размещен в геномной области маиса, а обратный праймер размещен в трансгенной вставке.

Прямой праймер (11-0-4127) (SEQ ID NO: 33): 5'- GGA CCC TGT TCA CAA CAC AGG GCT C-3'.

Обратный праймер (11-0-4128) (SEQ ID NO: 34): 5'- GGC CGA AGC TTC GGT CCG G-3'.

Последовательность ампликона (сайты связывания праймеров подчеркнуты) (SEQ ID NO: 35):
ggaccctgttcacaacacagggctctggcttggagcctctcgtttagcactgcacgtagtaccggaccgaagcttcaacacag

atctgatagtttaaacgctcttcaactggaagagcggttaccggaccgaagcttccggcc

Применяемое оборудование и материалы:

Оборудование/пластиковая лабораторная посуда	Спецификации
96-луночная ПЦР-система GeneAmp 9700	Applied Biosystems, г. Фостер-Сити, штат Калифорния, США; или эквивалент
Модуль для гель-электрофореза	Sub Cell GT, Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния, США; или эквивалент
Источник питания	Power Pac, Bio-Rad, г. Геркулес, штат Калифорния, США; или эквивалент
Гель-документирование	Система визуализации Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+; или эквивалент
	Программное обеспечение Quantity One, 2.0; или эквивалент
Пипетки с регулируемым объемом	Ranin, г. Уоберн, штат Массачусетс, США; Исследование: 0,5–10 мкл; 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл; или эквивалент
Фильтрующие наконечники	Подходящие для применяемых моделей пипеток
Пробирки и крышки для ПЦР-реакции	Applied Biosystems, г. Фостер-Сити, штат Калифорния, США; или эквивалент
Реакционные пробирки объемом 1,5 мл	Eppendorf, г. Гамбург, Германия; или эквивалент

Реагенты, буферы и растворы:

Реагент	Спецификации
Мастер-микс 2x Promega PCR Master Mix (содержит 15 mM MgCl ₂ и Taq-полимеразу)	Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США; или эквивалент
ПЦР-маркер	Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США; или эквивалент
Агароза UltraPure	Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США; или эквивалент
Бромид этидия	EMD, г. Дармштадт, Германия; или эквивалент
Нагрузочный краситель 6x Promega Blue Orange	Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США; или эквивалент
Буфер 10 x TBE	Mediatech, г. Херндон, штат Вирджиния, США; или эквивалент
Вода с чистотой для молекулярной биологии	Mediatech, г. Херндон, штат Вирджиния, США; или эквивалент

Процедуры.

Реагенты перед применением тщательно перемешивали. Готовили реакционную смесь, состоящую из всех компонентов ПЦР-реакции, за исключением ДНК-матрицы, в количестве, достаточном для проведения всех реакций. Реагенты и мастер-микс хранили на льду.

Приготовление мастер-микса для ПЦР-системы:

Компонент	Концентрация	Итоговая концентрация	мкл/реакция
Буфер для ПЦР Promega 2x	2 x	1 x	12,50
Прямой праймер (11-O-4127)	10 мкМ	200 нМ	0,50
Обратный праймер (11-O-4128)	10 мкМ	200 нМ	0,50
Стерильная вода			6,50
Общий объем			20,00

Компоненты смешивали и 20 мкл тщательно перемешанного мастер-микса дозировали в реакционные пробирки. Добавляли 5 мкл раствора 20 нг/мкл матричной геномной ДНК.

Контроли без матрицы: вместо геномной ДНК добавляли 5 мкл разбавителя, применяемого для разведения образцов тестируемой ДНК до надлежащей концентрации; например воду, 0,1x TE и т.п.

Положительные контроли: добавляли 5 мкл, например, 1% ДНК маиса DP-004114-3 (20 нг/мкл).

После добавления матрицы к мастер-миксу реакционные пробирки закрывали крышкой, немедленно помещали в предварительно нагретый прибор для ПЦР и инициировали опыт.

Параметры циклов.

ПЦР-анализ проводили с применением 96-луночной ПЦР-системы Applied Biosystems GeneAmp 9700 со скоростью разгона, установленной на значение "GeneAmp 9600". Параметры циклов были следующими.

ПЦР-профиль для способа обнаружения DP-004114-3

Этап	Элемент цикла		Т (°С)	Время (мин:с)	Число циклов
	Начальная денатурация		95	2:00	1x
	Амплификация	95	00:30	35x	35x
		66	00:30	00:30	
		72	00:30	00:30	
	Итоговая элонгация		72	07:00	1x

Гель-электрофорез.

Продукты ПЦР смешивали с достаточным количеством 6× загрузочного буфера для получения итоговой концентрации 1× загрузочного буфера (пример: 25 мкл продукта ПЦР плюс 5 мкл 6× загрузочного буфера). 15 мкл смеси продуктов ПЦР и загрузочного красителя загружали на гель агароза 2,5%/1× TBE. Разделение на геле проводили при максимум 7 В на 1 см (при измерении от электрода до электрода) до надлежащего разделения фрагментов. Разделение на геле было достаточно длительным, чтобы получить четкое разделение маркерных полос в диапазоне от 50 до 200 п.о. Агарозный гель окрашивали на бане с бромидом этидия (1,5 мкг на 1 мл дистиллированной воды или буфера) в течение приблизительно 15 мин, промывали дистиллированной водой или 1× TBE и фотографировали при УФ-свете с помощью соответствующей системы гель-документирования. Продукт ПЦР для маиса DP-004114-3 имел длину 149 п.о.

После иллюстрации и описания принципов настоящего изобретения специалистам в данной области должно быть очевидно, что схему и детали настоящего изобретения можно модифицировать без отступления от таких принципов. Настоящим заявляется, что все модификации находятся в рамках сущности и объема приложенных пунктов формулы изобретения.

Все публикации и опубликованные патентные документы, процитированные в данной спецификации, включены в настоящий документ путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и по отдельности обозначена как включенная путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ампликон, позволяющий определить ДНК, придающую растению кукурузы устойчивость к насекомым, содержащую последовательность SEQ ID NO: 6, в биологическом образце, где ампликон имеет последовательность SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 35, или последовательность, комплементарную по всей длине указанным последовательностям.

2. Способ обнаружения ДНК, содержащей SEQ ID NO: 6 и придающей растению кукурузы устойчивость к насекомым, где указанный способ включает:

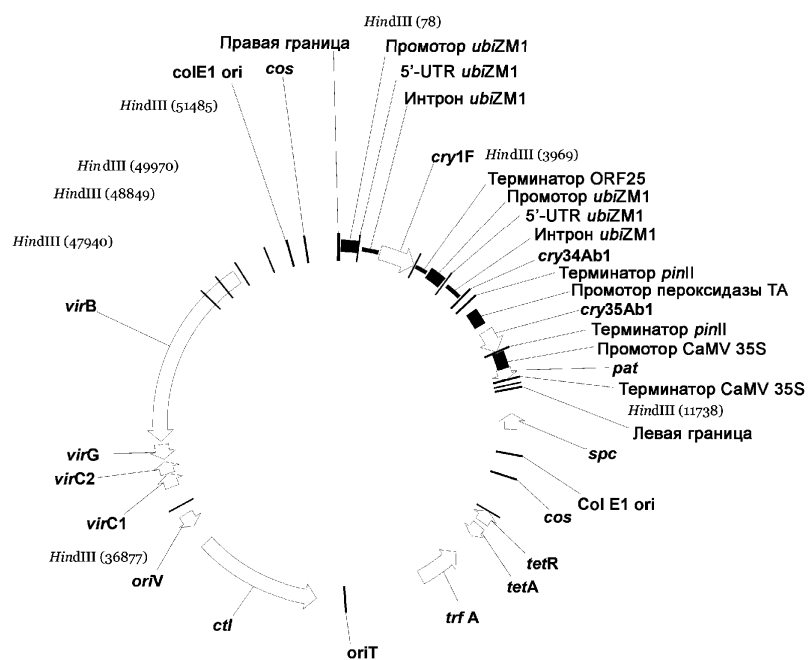
(а) обеспечение контактирования биологического образца, содержащего ДНК и полученного из растения, ткани или семени объекта кукурузы, с набором праймеров, продуцирующих ампликон по п.1, или молекулой ДНК зонда, которая гибридизируется в жестких условиях с ДНК, содержащей SEQ ID NO: 6, и которая не гибридизируется в этих же условиях с ДНК контрольного растения кукурузы;

(b) осуществление реакции амплификации нуклеиновых кислот и

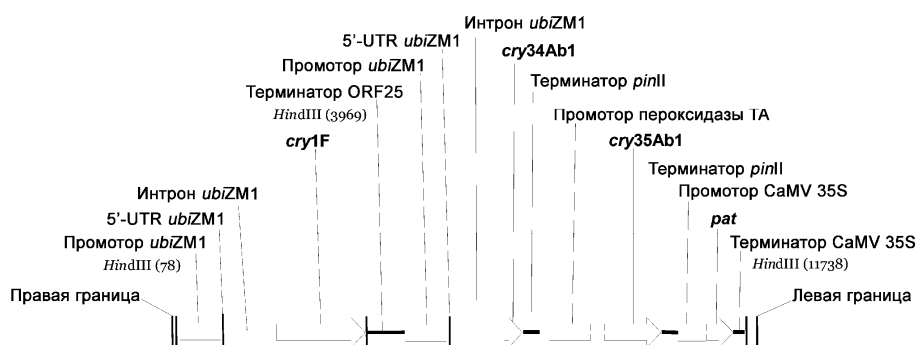
(с) обнаружение указанного ампликона или гибридизацию зонда с ДНК в образце.

3. Способ по п.2, в котором указанный биологический образец получают из кукурузной муки или непросеянной кукурузной муки.

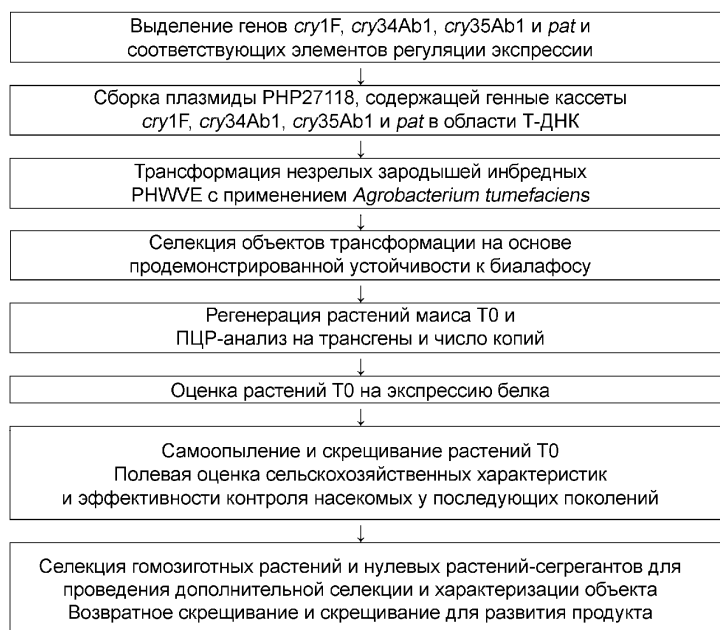
4. Пара полинуклеотидных праймеров, содержащая первый полинуклеотидный праймер и второй полинуклеотидный праймер, причем первый полинуклеотидный праймер содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 29 или последовательность, комплементарную указанной последовательности; и второй полинуклеотидный праймер содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 30 или последовательность, комплементарную указанной последовательности, для выявления в биологическом образце ампликона, содержащего SEQ ID NO: 32, позволяющего определить ДНК, придающую растению кукурузы устойчивость к насекомым и содержащую последовательность SEQ ID NO: 6.



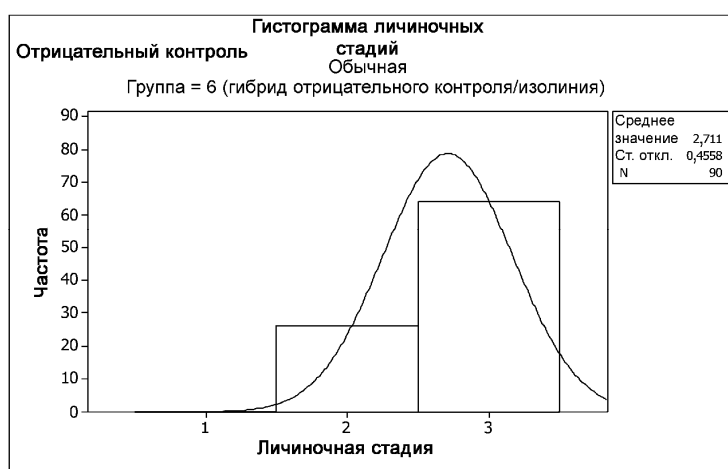
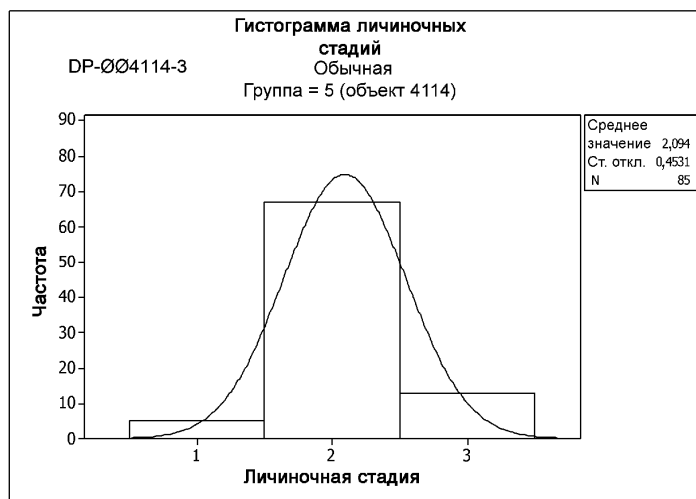
Фиг. 1



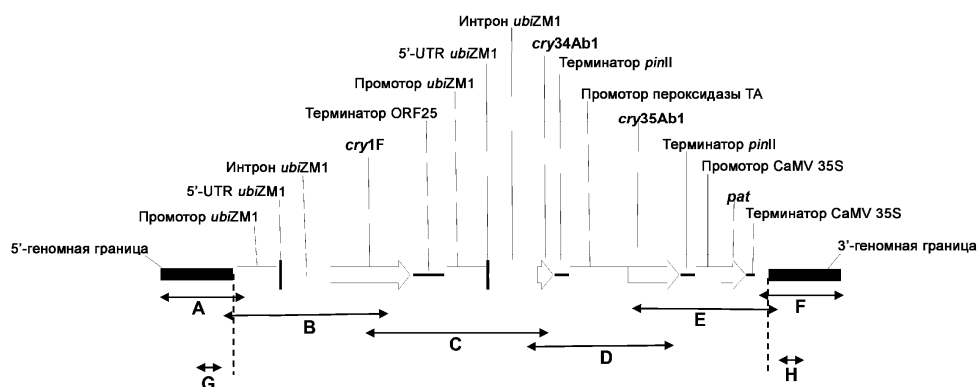
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2