(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092524 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

(22) Дата подачи заявки
2012.05.11

(51) Int. Cl. ***C12N 15/82*** (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/485,876**
(32) **2011.05.13**
(33) **US**
(62) **201891802; 2012.05.11**

(71) Заявитель:
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
Фласинский Станислав, Фоут Барретт К., Уфэтолл Мохаммед, Шультц Рэндалл Даблю., Вей Сяопин, Ву Вей, Янг Сиав-Пин (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам и конструкциям ДНК, включая их нуклеотидные последовательности, которые могут быть использованы для модуляции экспрессии генов в растениях и в клетках растений. Настоящее изобретение также относится к трансгенным растениям, к клеткам растений, к частям растений, к их семенам и к пищевым продуктам, содержащим молекулы ДНК, функционально присоединенные к гетерологичным транскрибируемым полинуклеотидам, а также к способам их применения.

202092524 A2

202092524 A2

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Описание

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке испрашивается преимущество предварительной заявки США No. 61/485876, поданной 13 мая 2011, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, который содержится в файле под именем «MONS304WO.txt» и имеет размер 463 килобайт (как указано в Microsoft Windows®), был создан в виде электронного документа 9 мая 2012 и вводится в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений, а также к молекулам ДНК, используемым для модуляции экспрессии генов в растениях.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Регуляторные элементы представляют собой генетические элементы, которые регулируют активность генов посредством модуляции транскрипции функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Такими элементами являются промоторы, лидерные последовательности, интроны и 3′-нетранслируемые области, которые могут быть использованы в области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений.

ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым регуляторным элементам генов, таким как промоторы, лидерные последовательности и интроны, которые происходят от растения вида *Cucumis melo*, обычно называемого канталупской дыней (мускатной дыней), и которые могут быть использованы в растениях. Настоящее изобретение также относится к ДНК-конструкциям, клеткам трансгенных растений, растениям и семенам, содержащим регуляторные элементы. Представленные

последовательности могут быть функционально присоединены к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, которая может быть гетерологичной по отношению к описанной в настоящем описании регуляторной последовательности. Настоящее изобретение также относится к способам получения и применения регуляторных элементов, ДНК-конструкций, содержащих такие регуляторные элементы; клеток трансгенных растений; растений и семян, содержащих регуляторные элементы, функционально присоединенные к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

Таким образом, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к молекуле ДНК, такой как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле. В конкретных вариантах изобретения, группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212. В конкретных вариантах изобретения, гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула содержит ген, представляющий агрономический интерес; ген, сообщающий растениям резистентность к гербицидам, или ген, сообщающий растениям резистентность к насекомым-вредителям.

Настоящее изобретение также относится к клеткам трансгенных растений, содержащим молекулу ДНК, такую как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле. Кроме того, группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон регулируют экспрессию гена. Клетками трансгенных растений могут быть клетки однодольных или двудольных растений.

Настоящее изобретение также относится к трансгенному растению или к части трансгенного растения, содержащим молекулу ДНК, такую как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле. В конкретных вариантах изобретения, трансгенным растением может быть потомство растения любой генерации, которое содержит группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерную последовательность или интрон.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к семенам трансгенных растений, содержащим молекулу ДНК, такую как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на

85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта из трансгенного растения, части трансгенного растения или из семян трансгенного растения, содержащих молекулу ДНК, такую как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле. В одном из вариантов изобретения, таким пищевым продуктом является концентрат белка, изолят белка, зерно, крахмал, семена, кормовая мука, мука, биомасса или растительное масло.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к пищевому продукту, содержащему молекулу ДНК, такую как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, включающие полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; b) последовательности, включающей любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, обладающих активностью регуляции генов, где указанная молекула

ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу экспрессии транскрибируемой полинуклеотидной молекулы в трансгенном растении с использованием молекулы ДНК, такой как группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции, или промотор, или лидерная последовательность или интрон, имеющие последовательность ДНК, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212 или содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, или состоит из фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212; и к способу культивирования указанного трансгенного растения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Последовательности SEQ ID NO: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 162, 167, 168, 172, 175, 176, 177, 178, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 211 и 212 представляют собой группы экспрессионных элементов регуляции транскрипции или последовательности EXP *Cucumis*, которые состоят из промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу; или из промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу и к интронному элементу; или из промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу, функционально присоединенному к интронному элементу, функционально присоединенному к лидерному элементу.

Последовательности SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169

представляют собой промоторные элементы.

Последовательности SEQ ID NO: 3, 164, 166 и 170 представляют собой лидерные последовательности.

Последовательности SEQ ID NO: 4, 165 и 171 представляют собой интронные последовательности.

Последовательности SEQ ID NO: 157, 160, 173, 179 и 186 представляют собой последовательности, в которых промотор функционально присоединен к лидерному элементу.

Последовательности SEQ ID NO: 158, 161, 174, 180 и 187 представляют собой последовательности, в которых интрон функционально присоединен к лидерному элементу.

Краткое описание графического материала

На фиг. 1a-1f проиллюстрировано выравнивание вариантов промоторных сегментов, соответствующих промоторным элементам, выделенным из растения *Cucumis melo*. В частности, на фиг. 1a-1f проиллюстрировано выравнивание промоторной последовательности в 2068 п.н. P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2), присутствующей в группе экспрессионных элементов регуляции транскрипции EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), и промоторных последовательностей, полученных посредством 5′-делеций промотора, P-CUCme.Ubq1-1:1:15. В результате делеции, например, у 5′-конца P-CUCme.Ubq1-1:1:15, были получены промоторы P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6); 1459 п.н.-промотор, присутствующий в EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5); P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8), 964 п.н.-последовательность, содержащаяся в EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7); P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10), 479 п.н.-последовательность, содержащаяся в EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9); и P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12), 173 п.н.-последовательность, содержащаяся в EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11).

Подробное описание изобретения

Описанное в настоящем описании изобретение относится к полинуклеотидным молекулам, которые были получены из растений *Cucumis melo*, обладающих нужной активностью регуляции генов. В настоящей заявке описаны также конструирование, конструкции и применение этих полинуклеотидных молекул. Нуклеотидные

последовательности этих полинуклеотидных молекул представлены в SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212. Эти полинуклеотидные молекулы, например, обладают способностью влиять на экспрессию функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы в тканях растений, что позволяет осуществлять селективную регуляцию экспрессии генов или активности кодируемого генного продукта в трансгенных растениях. Настоящее изобретение также относится к способам модификации, продуцирования и применения таких молекул. Настоящее изобретение также относится к композициям, к трансформированным клеткам-хозяевам, к трансгенным растениям и к семенам, содержащим указанные промоторы и/или другие описанные нуклеотидные последовательности, и к способам их получения и применения.

Для лучшего понимания настоящего изобретения и для облегчения практического осуществления настоящего изобретения специалистом ниже приводятся определения и описание способов его осуществления. Если это не оговорено особо, то употребляемые в настоящем описании термины следует понимать в их общепринятом значении, известном специалистам в данной области.

Молекулы ДНК

Используемый в настоящем описании термин «ДНК» или «молекула ДНК» означает двухцепочечную молекулу ДНК геномного или синтетического происхождения, то есть, этот термин означает полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидных оснований, или полинуклеотидную молекулу, считываемую в направлении от 5′-го конца (расположенного выше) до 3′-го конца (расположенного ниже). Используемый в настоящем описании термин «последовательность ДНК» означает нуклеотидную последовательность молекулы ДНК.

Используемый в настоящем описании термин «выделенная молекула ДНК» означает молекулу ДНК, которая по меньшей мере частично отделена от других молекул, обычно ассоциирующихся с этой молекулой в нативном или природном состоянии. В одном из вариантов изобретения, термин «выделенный» относится к молекуле ДНК, по меньшей мере частично отделенной от некоторых нуклеиновых кислот, которые, по своей природе, фланкируют данную

молекулу ДНК в ее нативном или природном состоянии. Таким образом, молекулы ДНК, присоединенные к регуляторным или кодирующим последовательностям, с которыми они обычно не ассоциированы в природе, например, в результате проведения методов рекомбинации, рассматриваются в настоящем описании как выделенные молекулы. Такие молекулы считаются выделенными, если они интегрированы в хромосому клетки-хозяина или присутствуют в растворе нуклеиновой кислоты вместе с другими молекулами ДНК, в которых они не присутствуют в их нативном состоянии.

В настоящем изобретении раскрывается ряд методов, которые, как известно, могут быть применены для выделения и модификации молекулы ДНК или ее фрагментов. Так, например, технология ПЦР (полимеразной цепной реакции) может быть применена для амплификации конкретной исходной молекулы ДНК и/или для продуцирования вариантов исходной молекулы. Молекулы ДНК или их фрагменты могут быть также получены другими методами, такими как прямой химический синтез фрагмента, обычно осуществляемый с использованием автоматического синтезатора олигонуклеотидов.

Используемый в настоящем описании термин «идентичность последовательностей» означает степень идентичности двух оптимально выровненных полинуклеотидных последовательностей или двух оптимально выровненных полипептидных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей осуществляют путем сопоставления двух последовательностей вручную, например, эталонной последовательности и другой последовательности для максимизации числа нуклеотидных соответствий в сопоставляемых последовательностях вместе с соответствующими внутренними нуклеотидными инсерциями, делециями или пробелами. Используемый в настоящем описании термин «эталонная последовательность» означает последовательность, представленную как полинуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212.

Используемый в настоящем описании термин «процент идентичности последовательностей» или «процент идентичности» или «% идентичности» означает степень идентичности, умноженную на 100. «Степень идентичности» последовательности, оптимально выровненной с эталонной последовательностью, означает число

нуклеотидных соответствий при оптимальном выравнивании, деленное на общее число нуклеотидов в эталонной последовательности, например, на общее число нуклеотидов в полноразмерной эталонной последовательности. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей последовательность, которая, при ее оптимальном выравнивании с эталонной последовательностью, представленной в настоящем описании как SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, по меньшей мере приблизительно на 85 процентов, по меньшей мере приблизительно на 90 процентов, по меньшей мере приблизительно на 95 процентов, по меньшей мере приблизительно на 96 процентов, по меньшей мере приблизительно на 97 процентов, по меньшей мере приблизительно на 98 процентов, или по меньшей мере приблизительно на 99 процентов идентична эталонной последовательности. В конкретных вариантах изобретения, такие последовательности могут быть определены как последовательности, обладающие активностью регуляции генов или кодирующие пептид, обладающий функциями, определяющими локализацию функционально присоединенного полипептида в клетке.

Регуляторные элементы

Регуляторный элемент представляет собой молекулу ДНК, обладающую активностью регуляции генов, то есть, способностью влиять на транскрипцию и/или трансляцию функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Таким образом, термин «активность регуляции генов» означает способность данного элемента влиять на характер экспрессии функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы посредством воздействия на транскрипцию и/или трансляцию этой функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Используемая в настоящем описании группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP) может состоять из экспрессионных элементов, таких как энхансеры, промоторы, лидерные последовательности и интроны, которые являются функционально связанными. Таким образом, группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции может состоять, например, из промотора, функционально присоединенного к 5’-концу

лидерной последовательности, которая, в свою очередь, функционально присоединена к 5'-концу интронной последовательности. Интронная последовательность может состоять из последовательности, начинающейся в первой точке сплайсинга интрона/экзона нативной последовательности, а также из небольшого лидерного фрагмента, включающего вторую точку сплайсинга интрона/экзона, в результате чего обеспечивается «правильный» процессинг интрона/экзона и облегчается транскрипция и «правильный» процессинг полученного транскрипта. Лидерные последовательности и интроны могут положительно влиять на транскрипцию функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, а также на трансляцию полученной транскрибируемой РНК. Предварительно процессированная молекула РНК содержит лидерные последовательности и интроны, которые могут влиять на посттрансляционный процессинг транскрибированной РНК и/или на высвобождение транскрибированной молекулы РНК из клеточного ядра в цитоплазму. После посттрансляционного процессинга транскрибированной молекулы РНК, лидерная последовательность может сохраняться как часть конечной матричной РНК и положительно влиять на трансляцию молекулы матричной РНК.

Регуляторными элементами, такими как промоторы, лидерные последовательности, интроны и области терминации транскрипции, являются молекулы ДНК, которые обладают активностью регуляции генов и составляют неотъемлемую часть общего механизма экспрессии генов в живых клетках. Термин «регуляторный элемент» означает молекулу ДНК, обладающую активностью регуляции генов, то есть, способностью влиять на транскрипцию и/или трансляцию функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Поэтому, выделенные регуляторные элементы, такие как промоторы и лидерные последовательности, функционирующие в растениях, могут быть использованы для модификации фенотипов растений с применением методов генной инженерии.

Регуляторные элементы могут быть охарактеризованы (количественно и/или качественно) по эффекту их профиля экспрессии, например, по позитивному или негативному и/или

конститутивному или другому профилю экспрессии, например, по временному профилю; пространственному профилю; эволюционному профилю; тканеспецифическому профилю; профилю, специфическому к действию окружающей среды; физиологическому профилю; патологическому профилю; профилю, специфическому для данного клеточного цикла; и/или по профилю экспрессии, чувствительной к действию химикатов, и любой их комбинации, а также по количественным или качественным признакам. Промотор может быть использован как регуляторный элемент для модуляции экспрессии функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы.

Используемый в настоящем описании термин «профиль экспрессии гена» означает любой профиль транскрипции функционально присоединенной транскрибируемой молекулы ДНК с образованием транскрибированной молекулы РНК. Транскрибированная молекула РНК может быть транслирована с продуцированием молекулы белка или антисмысловой молекулы или другой регуляторной молекулы РНК, такой как дцРНК, тРНК, рРНК, миРНК и т.п.

Используемый в настоящем описании термин «экспрессия белка» означает любой профиль трансляции транскрибированной молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессия белка может быть охарактеризована по ее временным, пространственным, эволюционным или морфологическим качественным признакам, а также по количественным или качественным параметрам.

Используемый в настоящем описании термин «промотор» обычно означает молекулу ДНК, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы II и других белков (трансдействующих факторов транскрипции), и инициирует транскрипцию. Промотор изначально может быть отделен от 5'-нетранслируемой области (5' UTR) геномной копии гена. Альтернативно, промоторы могут быть получены путем синтеза или модификации молекул ДНК. Промоторы могут быть также химерными, то есть, они могут быть продуцированы посредством присоединения двух или более гетерологичных молекул ДНК. Промоторами, используемыми для осуществления настоящего изобретения, являются любые из SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169 или промоторные элементы,

содержащиеся в любой из SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах изобретения, такие молекулы и любые их варианты или производные, описанные в настоящей заявке, также определены как молекулы, обладающие промоторной активностью, то есть, способностью действовать как промоторы в клетках-хозяевах, например, в трансгенных растениях. В других конкретных вариантах изобретения, фрагмент может быть определен как промотор, обладающий активностью, сообщаемой исходной промоторной молекулой, от которой он происходит, либо этот фрагмент может содержать «минимальный промотор», который обеспечивает базальный уровень транскрипции и состоит из ТАТА-бокса или эквивалентной последовательности, распознающей комплекс РНК-полимеразы II и связывающейся с ним, и, тем самым, инициирует транскрипцию.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к фрагментам промоторной молекулы. Как описано выше, промоторные фрагменты обеспечивают активность промотора и могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими промоторами и их фрагментами, например, для конструирования химерных промоторов. В конкретных вариантах изобретения описаны фрагменты промоторов, содержащие по меньшей мере приблизительно 50, 95, 150, 250, 500, 750 или по меньшей мере приблизительно 1000 смежных нуклеотидов, или представляющие собой более длинную полинуклеотидную молекулу, обладающую описанной в настоящем описании промоторной активностью.

Композиции, происходящие от любого из промоторов, представленных как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169, или промоторных элементов, содержащихся в SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, и имеющих внутренние или 5'-делеции, могут быть получены, например, в целях улучшения или изменения экспрессии, способами, включающими удаление элементов, которые оказывают позитивное или негативное воздействие на экспрессию; дупликацию элементов, которые оказывают позитивное или негативное влияние на экспрессию; и/или дупликацию или удаление элементов, которые оказывают ткане- или клеткоспецифическое воздействие на экспрессию. Композиции, происходящие от любого из промоторов,

представленных как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169, или промоторных элементов, содержащихся в SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212 и имеющих 3'-делеции, в которых удалены элемент TATA-бокс или эквивалентная ему последовательность и расположенная ниже последовательность, могут быть использованы, например, для получения энхансерных элементов. Другие делеции могут быть введены для удаления любых элементов, которые оказывают позитивное или негативное воздействие на экспрессию; и сообщают экспрессии тканеспецифический, клеткоспецифический или времяспецифический (такие как, но не ограничивающийся ими, циркадные ритмы) эффект. Любой из промоторов, представленных как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169, или промоторных элементов, содержащихся в SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, и происходящие от них фрагменты или энхансеры могут быть использованы для получения химерных композиций элементов регуляции транскрипции, состоящих из любых промоторов, представленных как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 163 и 169, или промоторных элементов, содержащихся в SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, и происходящих от них фрагментов или энхансеров, функционально присоединенных к другим энхансерам и промоторам. Влияние описанных в настоящем описании модификаций, дупликаций или делеций на нужный уровень экспрессии конкретного трансгена может быть протестировано эмпирически в анализах растений в стабильном и переходном состоянии, таких как анализы, описанные в настоящем описании в рабочих примерах для подтверждения результатов, которые могут значительно варьироваться в зависимости от внесенных модификаций и от цели внесения этих модификаций в исходную молекулу.

Используемый в настоящем описании термин «лидерная последовательность» означает молекулу ДНК, выделенную из 5'-нетранслируемой области (5' UTR) геномной копии гена и определенную в общих чертах как нуклеотидный сегмент, расположенный между сайтом инициации транскрипции (TSS) и старт-сайтом белок-кодирующей последовательности. Альтернативно, лидерные последовательности могут быть получены путем синтеза или модификации элементов ДНК. Лидерная последовательность может

быть использована в качестве 5'-регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Лидерные молекулы могут быть использованы вместе с гетерологичным промотором или с их нативным промотором. Таким образом, промоторные молекулы согласно изобретению могут быть функционально присоединены к их нативной лидерной последовательности, либо они могут быть функционально присоединены к гетерологичной лидерной последовательности. Лидерными последовательностями, используемыми для осуществления настоящего изобретения, являются SEQ ID NO: 3, 164, 166 и 170, или лидерный элемент, содержащийся в SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах изобретения, такие последовательности могут быть определены как последовательности, обладающие способностью функционировать в качестве лидерной последовательности в клетках-хозяевах, включая, например, клетки трансгенных растений. В одном из вариантов изобретения, такие последовательности определяют как последовательности, обладающие лидерной активностью.

Лидерные последовательности (5' UTR), представленные как SEQ ID NO: 3, 164, 166 и 170, или лидерный элемент, содержащийся в любой из SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, могут состоять из регуляторных элементов, либо они могут принимать вторичные структуры, которые могут влиять на транскрипцию или трансляцию трансгена. Лидерные последовательности, представленные как SEQ ID NO: 3, 164, 166 и 170, или лидерный элемент, содержащийся в любой из SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением для получения химерных регуляторных элементов, влияющих на транскрипцию или трансляцию трансгена. Кроме того, лидерные последовательности, представленные как SEQ ID NO: 3, 164, 166 и 170, или лидерный элемент, содержащийся в любой из SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, могут быть использованы для получения химерных лидерных последовательностей, влияющих на транскрипцию или трансляцию трансгена.

Введение чужеродного гена в новое растение-хозяина не

всегда приводит к высокому уровню экспрессии встроенного гена. Кроме того, в случае возникновения проблем с комплексными признаками, иногда необходимо модулировать несколько генов с различными пространственными или временными профилями экспрессии. В принципе, такую модуляцию могут осуществлять интроны. Однако, многократное использование одного и того же интрона в одном трансгенном растении может приводить к негативным последствиям. В этих случаях необходимо иметь набор основных регуляторных элементов для конструирования соответствующих рекомбинантных элементов ДНК. Поскольку известный специалистам набор интронов, обладающих способностью повышать уровень экспрессии, ограничен, то необходимо найти альтернативные варианты.

Композиции, происходящие от любого из интронов, представленных как SEQ ID NO: 4, 165 и 171, или интронного элемента, содержащегося в SEQ ID NO: 13-199, 211 и 212, могут состоять из внутренних делеций или дупликаций цис-регуляторных элементов; и/или модификаций 5'- и 3'-последовательностей, содержащих точки сплайсинга интрон/экзон, и могут быть использованы для повышения уровня экспрессии или специфичности экспрессии в том случае, если они функционально присоединены к промотору + лидерному или химерному промотору + лидерной и кодирующей последовательности. Модификации 5'- и 3'-областей, содержащих точки сплайсинга интрон/экзон, могут быть также введены для снижения вероятности включения ложных старт- и стоп-кодонов, образующихся в полученном транскрипте после процессинга и сплайсинга матричной РНК. Интроны могут быть протестированы эмпирически, как описано в рабочих примерах для определения влияния интрона на экспрессию трансгена.

В соответствии с настоящим изобретением, промотор или фрагмент промотора могут быть проанализированы на присутствие известных промоторных элементов, то есть, на свойства последовательностей ДНК, таких как ТАТА-бокс и другие известные мотивы сайта связывания факторов транскрипции. Идентификация таких известных промоторных элементов может быть осуществлена специалистом для конструирования вариантов, характер экспрессии

которых аналогичен характеру экспрессии исходного промотора.

Используемые в настоящем описании термины «энхансер» или «энхансерный элемент» означают цис-действующий элемент регуляции транскрипции, иногда называемый цис-элементом, который является одним из аспектов всего профиля экспрессии, но который, сам по себе, является недостаточным для запуска транскрипции функционально присоединенной полинуклеотидной последовательности. В отличие от промоторов, энхансерные элементы обычно не включают сайт инициации транскрипции (TSS) или ТАТА-бокс или эквивалентную последовательность. Промотор, по своей природе, может содержать один или более энхансерных элементов, которые влияют на транскрипцию функционально присоединенной полинуклеотидной последовательности. Выделенный энхансерный элемент может быть также присоединен к промотору для продуцирования химерного промотора:цис-элемента, который является аспектом общей модуляции экспрессии генов. Промотор или промоторный фрагмент может содержать один или более энхансерных элементов, влияющих на транскрипцию функционально присоединенных генов. Очевидно, что многие промоторные-энхансерные элементы связываются с ДНК-связывающими белками и/или влияют на топологию ДНК с образованием локальных конформаций, которые обеспечивают селективный или ограниченный доступ РНК-полимеразы к ДНК-матрице или облегчают селективное расплетание двойной спирали в сайте инициации транскрипции. Энхансерный элемент может обладать функцией связывания с факторами транскрипции, регулирующими транскрипцию. Некоторые энхансерные элементы связываются более, чем с одним фактором транскрипции, и такие факторы транскрипции могут взаимодействовать с более, чем одним энхансерным доменом с различными аффинностями. Энхансерные элементы могут быть идентифицированы различными методами, включая анализ на делеции, то есть, делеции одного или более нуклеотидов у 5′-конца промотора или далее; анализ на ДНК-связывающий белок, проводимый с использованием футпринтинга ДНКазы I; анализ на интерферирующее действие метилирования; анализы методом сдвига электрофоретической подвижности; *in vivo* анализ на геномный футринтинг посредством ПЦР, опосредуемой лигированием; и другие

стандартные анализы; или анализы на сходство ДНК-последовательностей с использованием известных мотивов цис-элементов или энхансерных элементов, используемых в качестве последовательности-мишени или мотива-мишени, где указанные анализы проводят стандартными методами сравнения последовательностей ДНК, такими как BLAST. Тонкая структура энхансерного домена может быть дополнительно исследована с помощью мутагенеза (или замены) одного или более нуклеотидов, или другими стандартными методами. Энхансерные элементы могут быть получены методами химического синтеза или путем выделения из регуляторных элементов, которые включают такие элементы, и они могут быть синтезированы с использованием дополнительных фланкирующих нуклеотидов, содержащих подходящие рестрикционные сайты, для облегчения проведения последующих манипуляций. Таким образом, разработка, конструирование и использование энхансерных элементов с применением описанных в настоящем описании методов модуляции экспрессии функционально присоединенных транскрибируемых полинуклеотидных молекул входит в объем настоящего изобретения.

В растениях, включение некоторых интронов в генные конструкции приводит к повышению уровня мРНК и белков по сравнению с конструкциями, в которых интрон отсутствует. Такой эффект называется «интрон-опосредуемым усилением» (IME) экспрессии генов (Mascarenhas et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920). Интроны, которые, как известно, стимулируют экспрессию в растениях, были идентифицированы в генах кукурузы (например, tubAl, Adhl, Shi, Ubil (Jeon et al. (2000) *Plant Physiol.* 123: 1005-1014; Callis et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 1183-1200; Vasil et al. (1989) *Plant Physiol.* 91: 1575-1579; Christiansen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689) и в генах риса (например, соль; tpi: McElroy et al., *Plant Cell* 2: 163-171 (1990); Xu et al., *Plant Physiol.* 106:459-467 (1994)). Аналогичным образом, было обнаружено, что интроны генов двудольных растений, таких как петуния (например, *rbcS*), картофель (например, *st-lsl*) и резушка Таля (*Arabidopsis thaliana*) (например, *ubq3* и *patl*), способствуют повышению уровня

экспрессии генов (Dean et al. (1989) *Plant Cell* 1:201-208; Leon et al. (1991) *Plant Physiol.* 95:968-972; Norris et al. (1993) *Plant Mol Biol* 21:895-906; Rose and Last (1997) *Plant* 7.11:455-464). Было обнаружено, что делеции или мутации в сайтах сплайсинга интрона приводят к снижению уровня экспрессии генов, что указывает на то, что для IME может потребоваться сплайсинг (Mascarenhas et al. (1990) *Plant Mol Biol.* 15:913-920; Clancy and Hannah (2002) *Plant Physiol.* 130:918-929). Однако, в определенных случаях, сплайсинг *per se* не требуется для IME в двудольных растениях, но что указывают точковые мутации в сайтах сплайсинга гена *patl* от *A. thaliana* (Rose and Beliakoff (2000) *Plant Physiol.* 122:535-542).

Усиление экспрессии генов посредством интронов не является широко распространенным феноменом, поскольку инсерции некоторых интронов в рекомбинантные экспрессионные кластеры не приводят к усилению экспрессии (например, интронов от генов двудольных растений (гена *rbcS* гороха, гена фазеолина фасоли и гена *stls-1* растения *Solarium tuberosum*) и интронов от генов кукурузы (девятого интрона гена *adh1*, первого интрона гена *hsp81*)) (Chee et al. (1986) *Gene* 41:47-57; Kuhlemeier et al. (1988) *Mol Gen Genet* 212:405-411; Mascarenhas et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920; Sinibaldi and Mettler (1992) In WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology,* Vol 42. Academic Press, New York, pp 229-257; Vancanneyt et al. 1990 *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250). Поэтому, не каждый интрон может быть использован для изменения уровней экспрессии не-эндогенных генов или эндогенных генов в трансгенных растениях. До сих пор неизвестно, какими свойствами или конкретными отличительными признаками должна обладать интронная последовательность, чтобы она усиливала экспрессию данного гена, а поэтому, исходя из уже известной информации, невозможно предсказать, будет ли данный интрон растения, при его использовании в гетерологичной форме, вызывать IME.

Используемый в настоящем описании термин «химерный» относится к одной молекуле ДНК, продуцируемой путем присоединения первой молекулы ДНК ко второй молекуле ДНК, где ни

первая, ни вторая молекула ДНК не существуют в природе в такой конфигурации, то есть, они не присоединены друг к другу. Таким образом, химерная молекула ДНК представляет собой новую молекулу ДНК, которая обычно не существует в природе в том или ином виде. Используемый в настоящем описании термин «химерный промотор» означает промотор, продуцируемый посредством указанных модификаций молекул ДНК. Химерный промотор может быть объединен с двумя или более ДНК-фрагментами, например, он может представлять собой гибрид промоторного и энхансерного элемента. Таким образом, разработка, конструирование и использование химерных промоторов с применением описанных в настоящем описании методов модуляции экспрессии функционально присоединенных транскрибируемых полинуклеотидных молекул входит в объем настоящего изобретения.

Используемый в настоящем описании термин «вариант» означает вторую молекулу ДНК, которая имеет состав, аналогичный, но не идентичный составу первой молекулы ДНК, но которая все же сохраняет свои общие функциональные свойства, то есть, она имеет характер экспрессии, идентичный или аналогичный характеру экспрессии первой молекулы ДНК. Вариант может представлять собой более короткую или усеченную версию первой молекулы ДНК и/или модифицированную версию последовательности первой молекулы ДНК, такую как последовательность, имеющая другие рестрикционные сайты и/или внутренние делеции, замены и/или инсерции. Термин «вариант» может также охватывать регуляторный элемент, имеющий нуклеотидную последовательность, содержащую замену, делецию и/или инсерцию одного или более нуклеотидов исходной последовательности, где указанное производное регуляторного элемента обладает большей или меньшей транскрипционной или трансляционной активностью, чем соответствующая родительская регуляторная молекула, или эквивалентной активностью. «Варианты» регуляторных элементов могут также охватывать варианты, полученные в результате мутаций, которые обычно возникают после трансформации клеток бактерий и растений. В настоящем изобретении, полинуклеотидная последовательность, представленная как SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, может быть использована для

создания вариантов, которые по своему составу аналогичны, но не идентичны полинуклеотидной последовательности исходного регуляторного элемента, но которые все же сохраняют свои общие функциональные свойства, то есть, они имеют характер экспрессии, идентичный или аналогичный характеру экспрессии исходного регуляторного элемента. Способ создания таких вариантов согласно изобретению хорошо известен среднему специалисту в данной области и входит в объем настоящего изобретения. «Варианты» химерного регуляторного элемента содержат такие же составляющие элементы, как и последовательность исходного химерного регуляторного элемента, однако, компоненты, составляющие вариант химерного регуляторного элемента, могут быть функционально присоединены друг к другу различными методами, известными специалистам, такими как гидролиз рестриктирующими ферментами и лигирование; клонирование, не зависящее от лигирования; модульная сборка ПЦР-продуктов в процессе амплификации или прямой химический синтез химерного регуляторного элемента, а также другие методы, известные специалистам. Полученный «вариант» химерного регуляторного элемента состоит из таких же составляющих компонентов, как и исходная последовательность, или из их вариантов, но отличается по последовательности или по последовательностям, которые используются для функционально присоединения составляющих их компонентов. В настоящем изобретении, каждая из полинуклеотидных последовательностей, указанных как SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212, представляет собой исходную последовательность, в которой компоненты, составляющие эту последовательность, могут быть присоединены друг к другу известными методами, и могут иметь замены, делеции и/или инсерции одного или более нуклеотидов или мутаций, которые обычно образуются после трансформации клеток бактерий и растений.

Конструкции

Используемый в настоящем описании термин «конструкция» означает любую рекомбинантную полинуклеотидную молекулу, такую как плазмида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся полинуклеотидная молекула, фаг или линейная или кольцевая

одноцепочечная или двухцепочечная молекула ДНК- или РНК-полинуклеотида, происходящие от любого источника, способные к геномной интеграции или автономной репликации и содержащие полинуклеотидную молекулу, где одна или более полинуклеотидных молекул оперативно связаны друг с другом, то есть, функционально присоединены друг к другу. Используемый в настоящем описании термин «вектор» означает любую рекомбинантную полинуклеотидную конструкцию, которая может быть использована в целях трансформации, то есть, введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяина. Этот термин включает экспрессионный кластер, выделенный из любых вышеупомянутых молекул.

Используемый в настоящем описании термин «функционально присоединенный» относится к первой молекуле, присоединенной ко второй молекуле, где указанные молекулы имеют такое расположение, при котором первая молекула влияет на функцию второй молекулы. Эти две молекулы могут быть, а могут и не быть частью одной молекулы с непрерывной последовательностью, и могут иметь, а могут и не иметь смежные последовательности. Так, например, промотор считается функционально присоединенным к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, если он модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой полинуклеотидной молекулы в клетке. Так, например, лидерная последовательность функционально присоединена к кодирующей последовательности, если она служит в качестве лидерной последовательности для полипептида, кодируемого кодирующей последовательностью.

В одном из вариантов изобретения, конструкции согласно изобретению могут быть получены в виде ДНК-конструкций из двух граничных областей Ti-плазмиды, которые имеют правую граничную область (RB или AGRtu.RB) и левую граничную область (LB или AGRtu.LB) Ti-плазмиды, выделенной из бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей Т-ДНК, которая, вместе с транспортными молекулами, поставляемыми клетками *A. tumefaciens*, позволяет Т-ДНК интегрироваться в геном клетки растения (см., например, патент США 6603061). Эти конструкции могут также содержать сегменты ДНК плазмидного остова, которые обеспечивают функцию

репликации и позволяют проводить отбор с использованием антибиотика в бактериальных клетках, например, имеют ориджин репликации *Escherichia coli*, такой как *ori*322, то есть, ориджин репликации широкого круга хозяев, такой как oriV или oriRi, и кодирующую область для селективного маркера, такую как область Spec/Strp, которая кодирует аминогликозид-аденилтрансферазу Tn7 (*aad*A), сообщающую резистентность к селективному маркерному гену спектиномицина или стрептомицина, или гентамицина (Gm, Gent). Для трансформации растений, штаммом бактериального хозяина часто служит ABI, C58 или LBA4404 *A. tumefaciens*, однако, в настоящем изобретении могут быть использованы и другие штаммы, известные специалистам в области трансформации растений.

Существуют такие способы сборки и введения конструкций в клетки, при которых транскрибируемая полинуклеотидная молекула транскрибируется в функциональную молекулу мРНК, которая затем транслируется и экспрессируется в виде белкового продукта. Для осуществления настоящего изобретения могут быть применены стандартные композиции и методы получения и использования конструкций и клеток-хозяев, описанные, например, в руководствах *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition Volumes 1, 2, and 3* (2000) J.F. Sambrook, D.W. Russell, and N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Методы получения рекомбинантных векторов, которые являются особенно подходящими для трансформации растений, включают, но не ограничиваются ими, методы, описанные в патентах США №№ 4971908; 4940835; 4769061 и 4757011, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Векторы этих типов также описаны в научной литературе (см., например, Rodriguez, et al., *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston, (1988) and Glick, et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL. (1993)). Векторы, обычно используемые для экспрессии нуклеиновых кислот в высших растениях, хорошо известны специалистам, и такими векторами являются векторы, происходящие от опухоль-индуцирующей (Ti) плазмиды бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, et al, *Methods in Enzymology* 153: 253-277 (1987)).

Другие рекомбинантные векторы, подходящие для трансформации растений, включая контрольный вектор для переноса pCaMVCN, также описаны в научной литературе (см., например, Fromm, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828 (1985)).

В конструкцию могут быть включены различные регуляторные элементы, включая любые описанные в настоящем описании элементы. Любые такие регуляторные элементы могут быть использованы в комбинации с другими регуляторными элементами. Такие комбинации могут быть сконструированы или модифицированы так, чтобы они имели желательные регуляторные свойства. В одном из вариантов изобретения, конструкции согласно изобретению содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально присоединенный к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, функционально присоединенной к 3'-молекуле терминации транскрипции.

Конструкции согласно изобретению могут включать любой промотор или любую лидерную последовательность, описанные в настоящей заявке или известные специалистам. Так, например, промотор согласно изобретению может быть функционально присоединен к гетерологичной нетранслируемой 5'-лидерной последовательности, такой как последовательность, происходящая от гена белка «теплового шока» (см., например, патенты США No. 5659122 и 5362865). Альтернативно, лидерная последовательность согласно изобретению может быть функционально присоединена к гетерологичному промотору, такому как промотор транскрипта вируса мозаики цветной капусты 35S (см. патент США No. 5352605). Экспрессионными свойствами, сообщаемыми таким функциональным присоединением гетерологичных элементов, являются, но необязательно, хорошо известные комбинированные свойства, составленные из свойств промотора и лидерной последовательности, но, в большинстве случаев, они определяются с помощью эмпирического анализа экспрессии, индуцируемой функционально присоединенным гетерологичным промотором и лидерной последовательностью.

Используемый в настоящем описании термин «интрон» означает молекулу ДНК, которая может быть выделена или идентифицирована

из геномной копии гена и, по существу, определена как область, сплайсированная во время процессинга мРНК перед трансляцией. Альтернативно, интрон может представлять собой синтетически продуцированный или модифицированный элемент ДНК. Интрон может содержать энхансерные элементы, которые влияют на транскрипцию функционально присоединенных генов. Интрон может быть использован в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. ДНК-конструкция может содержать интрон, и такой интрон может быть, а может и не быть гетерологичным по отношению к транскрибируемой последовательности полинуклеотидной молекулы. Примерами известных интронов являются интрон актина риса (патент США No. 5641876) и интрон HSP70 кукурузы (патент США No. 5859347). Интронами, которые могут быть использованы для осуществления настоящего изобретения, являются интроны SEQ ID NO: 4, 165 и 171, или интронный элемент, содержащийся в любой из последовательностей SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212.

Используемый в настоящем описании термин «молекула 3'-терминации транскрипции» или «3'-UTR» означает молекулу ДНК, которая используется в процессе транскрипции для продуцирования 3′-нетранслируемой области (3'-UTR) молекулы мРНК. 3′-нетранслируемая область молекулы мРНК может быть получена путем специфического расщепления и 3'-полиаденилирования, иногда называемого поли-A-хвостом. 3'-UTR может быть функционально присоединена к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле и может быть расположена ниже этой молекулы, а также может включать полинуклеотиды, которые сообщают сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, влияющие на транскрипцию, процессинг мРНК или экспрессию генов. Считается, что поли-A-хвосты повышают стабильность мРНК и инициируют трансляцию. Примерами молекул 3'-терминации транскрипции являются 3′-область нопалин-синтазы (см., Fraley, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807 (1983)); 3′-область hspl7 пшеницы; 3′-область небольшой субъединицы гороха *Rubisco*; 3′-область E6 хлопчатника (патент США 6096950); 3′-области,

описанные в WO0011200A2; и 3'-UTR коиксина (патент США No. 6635806).

3'-UTR обычно с успехом используются для рекомбинантной экспрессии специфических генов. У животных, механизм действия 3'-UTR достаточно хорошо определен (например, Zhao et al., *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445 (1999); Proudfoot, *Nature* 322:562-565 (1986); Kim et al., *Biotechnology Progress* 19: 1620-1622 (2003); Yonaha and Proudfoot, *EMBO J.* 19:3770-3777 (2000); Cramer et al, *FEBS Letters* 498: 179-182 (2001); Kuerstem and Goodwin, *Nature Reviews Genetics* 4:626-637 (2003)). Эффективная терминация транскрипции РНК необходима для предупреждения нежелательной транскрипции не родственных по своим признакам (расположенных ниже) последовательностей, которые могут препятствовать реализации нужных признаков. Расположение множества экспрессионных генных кластеров в непосредственной близости друг к другу (например, в одной Т-ДНК) может приводить к подавлению экспрессии одного или более генов в указанной конструкции, в отличие от независимых инсерций (Padidam and Cao, *BioTechniques* 31:328-334 (2001). Это может препятствовать достижению адекватных уровней экспрессии, например, в тех случаях, когда желательно достичь высокого уровня экспрессии генов во всех кластерах.

В растениях, последовательности сигнала полиаденилирования пока еще точно не определены. Hasegawa et al., *Plant J.* 33: 1063-1072, (2003)) не смогли идентифицировать консервативные последовательности сигнала полиаденилирования в *in vitro* и *in vivo* системах растения *Nicotiana sylvestris* и определить фактическую длину первичного (не-полиаденилированного) транскрипта. «Слабая» 3'-UTR может генерировать сквозное прочитывание, которое может негативно влиять на экспрессию генов, расположенных в соседних экспрессионных кластерах (Padidam and Cao, *BioTechniques* 31:328-334 (2001)). Соответствующая регуляция терминации транскрипции может предупреждать сквозное прочитывание в последовательностях (например, в других экспрессионных кластерах), локализованных ниже, и позволяет также осуществлять эффективный «рециклинг»

РНК-полимеразы, что будет способствовать повышению уровня экспрессии генов. Эффективная терминация транскрипции (высвобождение РНК-полимеразы II из ДНК) является необходимой для повторной инициации транскрипции и, тем самым, непосредственно влияет на общий уровень транскрипта. После терминации транскрипции, зрелая мРНК высвобождается из сайта синтеза и становится матрицей для цитоплазмы. Эукариотические мРНК аккумулируются в виде поли(А)-форм *in vivo*, что создает определенные трудности при детектировании сайтов терминации транскрипции стандартными методами. Однако, предсказание функциональных и эффективных 3'-UTR биоинформативными методами затрудняется отсутствием консервативных последовательностей, которые позволили бы легко предсказать эффективную 3'-UTR.

С практической точки зрения, обычно преимущественным фактором является то, что 3'-UTR, используемая в трансгенном кластере, обладает нижеследующими свойствами. 3'-UTR должна оперативно и эффективно осуществлять терминацию транскрипции трансгена и предупреждать сквозное прочитывание транскрипта в любой из соседних последовательностей ДНК, которые могут состоять из другого трансгенного кластера, как это имеет место в случае множества кластеров, присутствующих в одной Т-ДНК или в соседней хромосомной ДНК, в которую была встроена Т-ДНК. 3'-UTR не должна снижать уровень транскрипционной активности, сообщаемой промотором, лидерной последовательностью и интронами, которые используются для инициации экспрессии трансгена. В области биотехнологии растений, 3'-UTR часто используется для инициации реакций амплификации обратно транскрибируемой РНК, экстрагированной из трансформированного растения, а также для (1) оценки уровня транскрипционной активности или экспрессии трансгенного кластера после их интеграции в хромосому растения; (2) оценки числа копий инсерций в ДНК растения; и (3) оценки зиготности полученных семян после скрещивания. 3'-UTR также используется в реакциях амплификации ДНК, экстрагированных из трансформированного растения, для оценки степени сохранности встроенного кластера.

3'-UTR, используемая при осуществлении экспрессии трансгена

в растениях, может быть идентифицирована, исходя из экспрессии экспрессированных последовательностей-меток (EST) в библиотеках кДНК, полученных из матричных РНК, выделенных из семян, цветков и других тканей, происходящих от лисохвоста (*Setaria italica* ((L.) Beauv). Библиотеки кДНК были получены из тканей, выделенных из селекционных видов растений, а именно, из тканей цветков, семян, листьев и корней. Полученные кДНК секвенировали различными методами секвенирования. Полученные EST собирали в кластеры с использованием биоинформационных компьютерных программ, таких как clc_ref_assemble_complete, версии 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Избыток транскрипта в каждом кластере определяли путем подсчета числа «считываний» кДНК для каждого кластера. Идентифицированные 3'-UTR могут состоять из последовательности, происходящей от последовательности кДНК, а также последовательности, происходящей от геномной ДНК. Последовательность кДНК используется для конструирования праймеров, которые затем применяются вместе с библиотеками GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA), созданными в соответствии с протоколом, рекомендованным производителями, для клонирования 3'-области соответствующей последовательности геномной ДНК с получением более длинной последовательности терминации. Анализ относительной избыточности транскрипта, осуществляемый путем прямой или нормализованной оценки наблюдаемых «считываний» для каждой библиотеки тканей, может быть применен для оценки свойств, относящихся к характеру экспрессии. Так, например, некоторые 3'-UTR могут присутствовать в транскриптах, которые наблюдаются в тканях корней в большем количестве, чем в листьях. Это позволяет предположить, что транскрипт в высокой степени экспрессируется в корнях, и что такой характер экспрессии в корнях может быть отнесен за счет регуляции транскрипции промотором, лидерной последовательностью, интронами или 3'-UTR. Эмпирический анализ 3'-UTR, идентифицированных по характеру экспрессии в конкретных органах, тканях или клетках, дает возможность идентифицировать 3'-UTR, которые усиливают экспрессию в органах, тканях или клетках конкретных типов.

Конструкции и векторы могут также включать транспортную пептид-кодирующую последовательность, которая экспрессирует связанный пептид, подходящий для доставки белкового продукта, а в частности, для доставки в хлоропласт, лейкопласт или в другую пластидную органеллу; в митохондрии, в пероксисому; в вакуоль или во внеклеточное пространство. Описание использования транспортных пептидов в хлоропластах можно найти в патенте США No. 5188642 и в патенте США No. 5728925. Многие белки, локализованные в хлоропластах, экспрессируются из ядерных генов в качестве предшественников и доставляются в хлоропласт под действием транспортного пептида хлоропластов (CTP). Примерами таких выделенных белков хлоропластов являются, но не ограничиваются ими, белки, ассоциированные с небольшой субъединицей (SSU) рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы, ферредоксином, ферредоксин-оксидоредуктазой, светоулавливающим комплексным белком I и белком II, тиоредоксином F, енолпирувил-шикимат-фосфат-синтазой (EPSPS), и транспортными пептидами, описанными в патенте США No. 7193133. Было продемонстрировано *in vivo* и *in vitro*, что не-хлоропластные белки могут быть доставлены в хлоропласт с использованием гибридных белков, содержащих гетерологичный CTP, и что CTP является достаточным для доставки белка в хлоропласт. Было показано, что введение подходящего транспортного белка хлоропластов, такого как CTP (CTP2) EPSPS *Arabidopsis thaliana* (см., Klee et al., *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442 (1987)) или CTP (CTP4) EPSPS *Petunia hybrida* (см., della-Cioppa et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877 (1986)), способствует доставке гетерологичных последовательностей белка EPSPS в хлоропласты трансгенных растений (см., патенты США №№. 5627061; 5633435; и 5312910 и EP 0218571; EP 189707; EP 508909; и EP 924299).

Транскрибируемые полинуклеотидные молекулы

Используемый в настоящем описании термин «транскрибируемая полинуклеотидная молекула» означает любую молекулу ДНК, способную транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, молекулы, имеющие белок-кодирующие последовательности и продуцирующие молекулы РНК, имеющие

последовательности, подходящие для супрессии генов. Термин «трансген» означает транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, гетерологичную клетке-хозяину по меньшей мере на геномном участке, и/или транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, которая была искусственно введена в геном клетки-хозяина в данном или в любом предшествующем поколении.

Промотор согласно изобретению может быть функционально присоединен к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, которая является гетерологичной по отношению к промоторной молекуле. Используемый в настоящем описании термин «гетерологичный» относится к комбинации двух или более полинуклеотидных молекул, если такая комбинация обычно не встречается в природе. Так, например, две молекулы могут происходить от различных видов, и/или две молекулы могут происходить от различных генов, например, от различных генов одного и того же вида или от тех же самых генов различных видов. Таким образом, промотор является гетерологичным по отношению к функционально присоединенной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, если такая комбинация обычно не встречается в природе, то есть, если такая транскрибируемая полинуклеотидная молекула, по своей природе, не является функционально присоединенной к промоторной молекуле.

Транскрибируемая полинуклеотидная молекула, по существу, может представлять собой любую молекулу ДНК, которая, предпочтительно, будет экспрессировать РНК-транскрипт. Такая экспрессия РНК-транскрипта может приводить к трансляции полученной молекулы мРНК и, тем самым, к экспрессии белка. Так, например, альтернативно, транскрибируемая полинуклеотидная молекула может быть сконструирована так, чтобы она, в конечном счете, способствовала снижению уровня экспрессии специфического гена или белка. В одном из вариантов изобретения, это может быть достигнуто с использованием транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, ориентированной в антисмысловом направлении. Вкратце, по мере транскрипции антисмысловой транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, РНК-продукт гибридизуется с комплементарной молекулой РНК внутри клетки и секвестрирует

такую молекулу. Такая дуплексная молекула РНК не может транслироваться в белок по механизму трансляции в клетке и разрушается в этой клетке. Любой ген может негативно регулироваться по такому механизму.

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к регуляторному элементу согласно изобретению, такому как элементы представленные как SEQ ID NO: 1-199, 211 и 212 и функционально присоединенные к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле так, что они модулируют транскрипцию транскрибируемой полинуклеотидной молекулы на нужном уровне или по нужному механизму после интеграции данной конструкции в геном клетки растения. В одном из вариантов изобретения, транскрибируемая полинуклеотидная молекула содержит белок-кодирующую область гена, а промотор влияет на транскрипцию молекулы РНК, которая транслируется и экспрессируется в виде белкового продукта. В другом варианте изобретения, транскрибируемая полинуклеотидная молекула содержит антисмысловую область гена, а промотор влияет на транскрипцию антисмысловой молекулы РНК, двухцепочечныой РНК или другой аналогичной ингибирующей молекулы РНК, что приводит к ингибированию экспрессии представляющей интерес специфической молекулы РНК в клетке-мишени хозяина.

Гены, представляющие агрономический интерес

Транскрибируемыми полинуклеотидными молекулами могут быть гены, представляющие интерес с точки зрения агрономии. Используемый в настоящем описании термин «ген, представляющий агрономический интерес» означает транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, которая, при ее экспрессии в конкретной ткани растения, в клетке или в клетке конкретного типа, сообщает нужные свойства, такие как свойства, ассоциированные с морфологией, физиологией, ростом, развитием, урожайностью, продуктивностью, питательной ценностью, резистентностью к болезням или к вредителям и/или устойчивостью к воздействию окружающей среды или к химикатам. Генами, представляющими агрономический интерес, являются, но не ограничиваются ими, гены, кодирующие белок, повышающий

урожайность; белок резистентности к стрессу; белок, регулирующий развитие; белок, регулирующий дифференцировку тканей; белок мемистемы; белок, чувствительный к условиям окружающей среды; белок, вызывающий старение; белок, чувствительный к действию гормонов; белок, ответственный за сбрасывание листьев; источник белка; белок, ответственный за поглощение влаги; белок, регулирующий цветение; белок семян; белок резистентности к гербицидам, белок резистентности к заболеванию; фермент биосинтеза жирной кислоты; фермент биосинтеза токоферола; фермент биосинтеза аминокислот; пестицидный белок; или любой другой агент, такой как антисмысловая молекула или молекула иРНК, нацеленная на конкретный ген для супрессии. Продукт гена, представляющего агрономический интерес, может действовать в растении и оказывать влияние на физиологию или метаболизм растения, либо он может действовать как пестицидный белок, который может потребляться вредителями, поедающими растение.

В одном из вариантов изобретения, промотор согласно изобретению вводят в конструкцию так, чтобы он был функционально присоединен к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, которой является ген, агрономический интерес. Экспрессия гена, представляющего агрономический интерес, является желательной для сообщения агрономически ценных признаков. Агрономически ценными признаками могут быть, например, но не ограничиваются ими, резистентность к гербицидам, устойчивость к поеданию насекомыми, повышенная урожайность, резистентность к грибковым заболеваниям, резистентность к вирусам, резистентность к нематодам, резистентность к заболеваниям, вызываемым бактериями; рост и развитие растений, продуцирование крахмала, продуцирование модифицированных масел, высокая продуктивность масла, содержание модифицированных жирных кислот, высокая продуктивность белка, созревание плодов, повышенная питательная ценность для животных и человека, содержание биополимеров, резистентность к стрессам, вызываемым окружающей средой, содержание фармацевтических пептидов и секретируемых пептидов, улучшенные технологические признаки, повышенная гидролизуемость, продуцирование ферментов, запах, фиксация азота, продуцирование гибридных семян,

продуцирование волокон и продуцирование биотоплива. Примерами генов, представляющими агрономический интерес, являются гены резистентности к гербицидам (патенты США No. 6803501; 6448476; 6248876; 6225114; 6107549; 5866775; 5804425; 5633435 и 5463175), гены, ответственные за повышение урожайности (патенты США NO. USRE38446; 6716474; 6663906; 6476295; 6441277; 6423828; 6399330; 6372211; 6235971; 6222098; и 5716837), гены устойчивости к поеданию насекомыми (патенты США NO.6809078; 6713063; 6686452; 6657046; 6645497; 6642030; 6639054; 6620988; 6593293; 6555655; 6538109; 6537756; 6521442; 6501009; 6468523; 6326351; 6313378; 6284949; 6281016; 6248536; 6242241; 6221649; 6177615; 6156573; 6153814; 6110464; 6093695; 6063756; 6063597; 6023013; 5959091; 5942664; 5942658 5880275; 5763245; и 5763241), гены резистентности к грибковым заболеваниям, (патенты США NO. 6653280; 6573361; 6506962; 6316407; 6215048; 5516671; 5773696; 6121436; 6316407; и 6506962), гены резистентности к вирусам (патенты США NO. 6617496; 6608241; 6015940; 6013864; 5850023; и 5304730), гены резистентности к нематодам, (патент США No. 6228992), гены резистентности к заболеваниям, вызываемым бактериями (патент США No. 5516671), гены, ответственные за рост и развитие растений (патент США NO. 6723897 и 6518488), гены, ответственные за продуцирование крахмала (патенты США NO. 6538181; 6538179; 6538178; 5750876; 6476295), гены, ответственные за продуцирование модифицированных масел (патенты США NO. 6444876; 6426447; и 6380462), гены, ответственные за высокую продуктивность масла (патенты США NO. 6495739; 5608149; 6483008; и 6476295), гены, ответственные за содержание модифицированных жирных кислот (патенты США NO. 6828475; 6822141; 6770465; 6706950; 6660849; 6596538; 6589767; 6537750; 6489461; и 6459018), гены, ответственные за высокую продуктивность белка (патент США No. 6380466), гены, ответственные за созревание плодов (патент США No. 5512466), гены, ответственные за повышенную питательную ценность для животных и человека (патенты США NO. 6723837; 6653530; 6541259; 5985605; и 6171640), гены биополимеров (патенты США NO. USRE37543; 6228623; и 5958745 и 6946588), гены резистентности к

стрессам, вызываемым окружающей средой (патент США No. 6072103), гены фармацевтических пептидов и секретируемых пептидов (патенты США NO. 6812379; 6774283; 6140075 и 6080560), гены, ответственные за улучшенные технологические свойства, (патент США No. 6476295), гены, ответственные за повышенную гидролизуемость (патент США No. 6531648), гены, ответственные за низкое содержание раффинозы (патент США № 6166292), гены, которые могут быть использованы для промышленного производства ферментов (патент США No. 5543576), гены, ответственные за улучшение запаха (патент США No. 6011199), гены фиксации азота (патент США No. 5229114), гены, ответственные за продуцирование гибридных семян (патент США No. 5689041), гены, ответственные за продуцирование волокна (патенты США NO. 6576818; 6271443; 5981834; и 5869720) и гены, ответственные за продуцирование биотоплива (патент США No. 5998700).

Альтернативно, ген, представляющий агрономический интерес, может влиять на вышеупомянутые свойства или фенотипы растений посредством кодирования молекулы РНК, которая вызывает нацеленную модуляцию экспрессии эндогенного гена, например, посредством антисмысловой последовательности (см, например, патент США 5107065); ингибирующей РНК («РНКи», включая модуляцию экспрессии гена посредством механизмов, опосредуемых миRNA-, киRNA-, трансдействующей киRNA- и фазоспецифической кРНК, например, как описано в опубликованных заявках США 2006/0200878 и 2008/0066206, и в заявке на патент США 11/974469); или механизмов, опосредуемых ко-супрессией. РНК может также представлять собой каталитическую молекулу РНК (например, рибозим или рибопереключатель; см., например, US 2006/0200878), сконструированую так, чтобы она расщепляла нужный эндогенный продукт мРНК. Таким образом, для осуществления настоящего изобретения может быть использована любая транскрибируемая полинуклеотидная молекула, которая кодирует транскрибируемую молекулу РНК, влияющую на агрономически важный фенотип или представляющее интерес морфологическое изменение. Специалистам хорошо известны методы создания конструкций и их введения в клетку так, чтобы транскрибируемая полинуклеотидная молекула

транскрибировалась в молекулу, способную осуществлять супрессию гена. Так, например, посттранскрипционная супрессия гена, достигаемая с использованием конструкции, содержащей антисмысловую транскрибируемую полинуклеотидную молекулу и созданной для регуляции экспрессии генов в клетках растений, описана в патентах США No. 5107065 и 5759829, а посттранскрипционная супрессия гена, достигаемая с использованием конструкции, содержащей смысловую транскрибируемую полинуклеотидную молекулу и созданной для регуляции экспрессии генов в растениях, описана в патентах США NO. 5283184 и 5231020. Экспрессия транскрибируемого полинуклеотида в клетках растений может быть также осуществлена в целях борьбы с насекомыми-вредителями, поедающими такое растение, например, для этой цели могут быть использованы композиции, выделенные из жесткокрылых вредителей растений (публикация патента США No. US20070124836), и композиции, выделенные из вредителей-нематод (публикация патента США No. US20070250947). Вредителями растений являются, но не ограничиваются ими, членистоногие, нематоды, грибы или микробы. Репрезентативными транскрибируемыми полинуклеотидными молекулами, используемыми для включения в конструкции согласно изобретению, являются, например, молекулы ДНК или гены, происходящие от видов, отличающихся от видов-мишеней, или гены, происходящие от тех же самых видов или присутствующие в тех же самых видах, но включенные в клетки реципиента методами генной инженерии, а не классическими методами репродуцирования или скрещивания. Такими типами полинуклеотидных молекул могут быть, но не ограничиваются ими, полинуклеотидная молекула, которая уже присутствует в клетках растений; полинуклеотидная молекула, происходящая от другого растения; полинуклеотидная молекула, происходящая от другого организма; или экзогенно продуцируемая полинуклеотидная молекула, например, полинуклеотидная молекула, содержащая антисмысловой транскрипт гена; или полинуклеотидная молекула, кодирующая искусственный, синтетический или как-либо иначе модифицированный вариант трансгена.

Селективные маркеры

Используемый в настоящем описании термин «маркер» означает любую транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, которая может быть скринирована или оценена на экспрессию или ее отсутствие различными способами. Маркерными генами, используемым для осуществления настоящего изобретения, являются, но не ограничиваются ими, транскрибируемые полинуклеотидные молекулы, кодирующие β-глюкуронидазу (GUS, описанную в патенте США No. 5599670), белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра, и его варианты (GFP, описанный в патентах США No. 5491084 и 6146826), белки, сообщающие резистентность к антибиотикам, или белки, сообщающие устойчивость к гербицидам. Подходящими маркерами резистентности к антибиотикам являются маркеры, кодирующие белки, сообщающие резистентность к канамицину (*npt*II), гигромицину B (*aph*IV), стрептомицину или спектиномицину (*aad*, spec/strep), и к гентамицину (*aac3* и *aacC4*). Гербицидами, к которым, как было продемонстрировано, устойчивы трансгенные растения, и к которым могут быть применены способы согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими: аминометилфосфоновая кислота, глифосат, глюфозинат, сульфонилмочевины, имидазолиноны, бромоксинил, делапон, дикамба, циклогександион, ингибиторы протопорфириногеноксидазы и изоксафлутоловые гербициды. Транскрибируемыми полинуклеотидными молекулами, кодирующими белки, сообщающие устойчивость к гербицидам, являются, но не ограничиваются ими, транскрибируемая полинуклеотидная молекула, кодирующая 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS, обладающая устойчивостью к глифосату, описана в патентах США No. 5627061; 5633435; 6040497; и 5094945); транскрибируемая полинуклеотидная молекула, кодирующая глифосат-оксидоредуктазу и глифосат-N-ацетилтрансферазу (GOX, описанная в патенте США No. 5463175; GAT, описанная в публикации патента США No. 20030083480, и дикамба-монооксигеназа, описанная в публикации патента США No. 20030135879); транскрибируемая полинуклеотидная молекула, кодирующая бромоксинил-нитрилазу (*Bxn*, ген устойчивости к бромоксинилу, описанный в патенте США No. 4810648); транскрибируемая полинуклеотидная молекула, кодирующая фитоен-дезатуразу (*crtI*, ген устойчивости к

норфлуразону, описанный в публикации Misawa, et al., *Plant Journal* 4:833-840 (1993) и Misawa, et al, *Plant Journal* 6:481-489 (1994)); транскрибируемая полинуклеотидная молекула, кодирующая ацетогидроксикислота-синтазу (AHAS, иногда обозначаемую ALS), описанную в публикации Sathasiivan, et al., *Nucl. Acids Res.* 18:2188-2193 (1990) и обладающую устойчивостью к гербицидам на основе сульфонилмочевины; и ген *bar* (описанный в публикации DeBlock, et al., *EMBO Journal* 6:2513-2519 (1987)), обладающий устойчивостью к глюфозинату и биалафосу. Промоторные молекулы согласно изобретению могут экспрессировать связанные транскрибируемые полинуклеотидные молекулы, кодирующие фосфинотрицин-ацетилтрансферазу, глифосат-резистентную EPSPS, аминогликозид-фосфотрансферазу, гидроксифенилпируват-дегидрогеназу, гигромицин-фосфотрансферазу, неомицин-фосфотрансферазу, далапон-дегалогеназу, бромоксинил-резистентную нитрилазу, антранилатсинтазу, арилоксиалканоат-диоксигеназы, ацетил-CoA-карбоксилазу, глифосат-оксидоредуктазу и глифосат-N-ацетилтрансферазу.

Термин «селективные маркеры» также включает гены, кодирующие селективный маркер, секреция которого может быть детектирована как средство для идентификации или отбора трансформированных клеток. Примерами являются маркеры, кодирующие секретируемый антиген, который может быть идентифицирован посредством взаимодействия антител, или даже секретируемые ферменты, которые могут быть детектированы каталитически. Селективные секретируемые маркерные белки подразделены на ряд классов, включая небольшие диффундируемые белки, которые являются детектируемыми (например, с помощью ELISA), небольшие активные ферменты, которые детектируются во внеклеточном растворе (например, альфа-амилаза, бета-лактамаза, фосфинотрицин-трансфераза), или белки, которые включены в клеточную стенку или захвачены ею (например, белки, которые включают лидерную последовательность, такую как лидерная последовательность, присутствующая в экспрессионном элементе удлинения, или белки, ассоциированные с патогенезом табака, также известные, как PR-S-табак). Другие возможные селективные

маркеры известны специалистам и входят в объем настоящего изобретения.

Трансформация клеток

Настоящее изобретение также относится к способу продуцирования трансформированных клеток и растений, содержащих промотор, функционально присоединенный к транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

Термин «трансформация» означает введение нуклеиновой кислоты хозяину-реципиенту. Используемый в настоящем описании термин «хозяин» означает бактерии, грибы или растения, включая любые клетки, ткани, органы или потомство бактерий, грибов или растений. Представляющими особый интерес тканями и клетками растений являются протопласты, каллус, корни, клубни, семена, стебли, листья, проростки, эмбрионы и пыльца.

Используемый в настоящем описании термин «трансформированный» относится к клеткам, тканям, органам или организмам, в которые была введена чужеродная полинуклеотидная молекула, такая как конструкция. Введенная полинуклеотидная молекула может быть интегрирована в геномную ДНК клетки, ткани, органа или организма реципиента, так, чтобы введенная полинуклеотидная молекула наследовалась следующим потомством. «Трансгенная» или «трансформированная» клетка или организм также включают потомство клетки или организма и потомство, продуцированное по программе скрещивания с использованием такого трансгенного организма, как родитель, полученный при скрещивании и имеющий измененный фенотип, формирующийся в результате присутствия чужеродной полинуклеотидной молекулы. Термин «трансгенный» относится к бактериям, грибам или растениям, содержащим одну или более гетерологичных молекул полинуклеиновой кислоты.

Существует много методов введения молекул полинуклеиновой кислоты в клетки растений. Такие методы обычно включают стадии отбора подходящих клеток-хозяев, трансформации клеток-хозяев рекомбинантным вектором и получения трансформированных клеток-хозяев. Подходящими методами являются инфицирование бактериями (например, *Agrobacterium*), использование бинарных векторов на

основе бактериальных искусственных хромосом, прямая доставка ДНК (например, методом ПЭГ-опосредуемой трансформации, поглощения ДНК, опосредуемого дессикацией/ингибированием, электропорации, смешивания с волокнами карбида кремния и методом «выстреливания» с использованием ускорителя частиц, покрытых ДНК и т.п. (см. Potrykus, et al., *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205 (1991)).

Для трансформации клеток-хозяев одним или более промоторами и/или конструкциями согласно изобретению могут быть применены любые методы трансформации. Клетками-хозяевами могут быть любые клетки или организмы, такие как клетки растений, клетки водорослей, водоросли, клетки грибов, грибы, клетки бактерий или клетки насекомых. Предпочтительными хозяевами и трансформированными клетками являются клетки растений, *Aspergillus*, дрожжей, насекомых, бактерий и водорослей.

Регенерированные трансгенные растения могут подвергаться самоопылению с продуцированием гомозиготных трансгенных растений. Альтернативно, пыльца, полученная от регенерированных трансгенных растений, может быть скрещена с пыльцой не трансгенных растений, а предпочтительно, инбредных линий агрономически ценных видов. Описание методов скрещивания, которые обычно применяются для сообщения различных признаков и выращивания сельскохозяйственных культур, можно найти в одном или нескольких справочных руководствах, таких как, например, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of crop improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of variety development, Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987). И наоборот, пыльца не трансгенных растений может быть использована для опыления регенерированных трансгенных растений.

Трансформированные растения могут быть проанализированы на присутствие представляющих интерес генов и на уровень и/или характер экспрессии, сообщаемый регуляторными элементами согласно изобретению. Специалистам известно множество методов, подходящих для анализа трансформированных растений. Так, например, методами анализа растений являются, но не ограничиваются ими, саузерн-блот- или нозерн-блот-анализы, методы на основе ПЦР, биохимические анализы, методы скрининга фенотипов, оценка в полевых условиях и иммунодиагностические анализы. Уровень экспрессии транскрибируемой полинуклеотидной молекулы может быть оценен с использованием реагентов TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) и методов, описанных производителем, и путем определения времени циклов ПЦР с использованием оценочной матрицы TaqMan®. Альтернативно, для оценки экспрессии трансгенов могут быть использованы реагенты Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) и методы, описанные производителем.

Семена растений согласно изобретению могут быть собраны у оплодотворенных трансгенных растений и использованы для выращивания поколений потомства трансформированных растений согласно изобретению, включающих гибридные линии растений, содержащие конструкцию согласно изобретению, и для экспрессии гена, представляющего агрономический интерес.

Настоящее изобретение также относится к частям растений согласно изобретению. Частями растений являются, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, клубни, семена, эндосперм, семяпочки и пыльца. Настоящее изобретение также включает клетки трансформированных растений, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и относится к таким клеткам.

Трансгенное растение может передавать трансгеную полинуклеотидную молекулу своему потомству. Потомство включает любую регенерируемую часть растения или семена, содержащие трансген, происходящий от растения-предка. Трансгенное растение, предпочтительно, является гомозиготным по трансформированной полинуклеотидной молекуле и передает эту последовательность

потомству путем полового размножения. Потомство может быть выращено из семян, продуцированных трансгенным растением. Это потомство растений может быть затем подвергнуто самоопылению в целях продуцирования линии гомозиготных растений. Потомство от этих растений оценивают на экспрессию генов и т.п. Экспрессия генов может быть детектирована несколькими общеизвестными методами, такими как вестерн-блот-анализ, нозерн-блот-анализ, иммунопреципитация и ELISA.

Исходя из описанного в настоящем описании в общих чертах настоящего изобретения, его сущность может быть лучше понята специалистом из нижеследующих примеров, которые приводятся лишь в иллюстративных целях, и не рассматриваются как ограничение объема изобретения, если это не оговорено особо. Для специалиста в данной области очевидно, что методы, описанные в нижеследующих примерах, были предложены авторами изобретения как наиболее подходящие для осуществления настоящего изобретения. Однако, исходя из описания настоящего изобретения, для специалиста в данной области будет очевидно, что в конкретные варианты изобретения может быть внесено множество изменений, которые будут давать подобные или аналогичные результаты, не выходящие за рамки существа и объема изобретения, а поэтому, все предложенные или представленные в прилагаемом графическом материале объекты изобретения должны быть интерпретированы как объекты, которые приводятся лишь в иллюстративных целях, и не рассматриваются как ограничение объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Идентификация и клонирование регуляторных элементов

Последовательности новых элементов регуляции транскрипции или группы экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP) были идентифицированы и выделены из геномной ДНК двудольных растений вида *Cucumis melo* WSH-39-1070AN.

Элементы регуляции транскрипции были отобраны, исходя из запатентованных данных и из опубликованных данных микромассивов, полученных из экспериментальных анализов на профили транскрипции, проведенных на сое (*Glycine max*) и *Arabidopsis*, а

также из исследований по поиску гомологии, проводимых с использованием известных последовательностей двудольных растений, полученных по запрашиваемой у владельцев информации данных о последовательностях *Cucumis melo*.

С использованием идентифицированных последовательностей был проведен биоинформативный анализ по идентификации регуляторных элементов в амплифицированных ДНК, с последующей идентификацией сайта инициации транскрипции (TSS) и любых двунаправленных последовательностей, интронов или расположенных выше кодирующих последовательностей, присутствующих в данной последовательности. По результатам этого анализа были определены регуляторные элементы, присутствующие в последовательностях ДНК, и праймеры, сконструированные для амплификации регуляторных элементов. Соответствующая молекула ДНК для каждого регуляторного элемента была амплифицирована в стандартных условиях проведения полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, содержащих уникальные рестрикционные сайты и геномную ДНК, выделенную из растения *Cucumis melo*. Полученные ДНК-фрагменты лигировали в основные экспрессионные векторы растений стандартными методами гидролиза рестриктирующими ферментами в совместимых рестрикционных сайтах и методами лигирования ДНК.

Анализ регуляторного элемента TSS и точек сплайсинга интрон/экзон может быть осуществлен с использованием трансформированных протопластов растений. Вкратце, протопласты трансформировали экспрессионными векторами растений, содержащими клонированные ДНК-фрагменты, функционально присоединенные к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле, использовали 5'RACE-систему быстрой амплификации кДНК, cDNA Ends, Version 2.0 (Invtrogen, Carlsbad, California 92008) для подтверждения присутствия регуляторного элемента TSS и точек сплайсинга интрон/экзон путем анализа продуцированной таким образом, последовательности мРНК-транскриптов.

Последовательности, кодирующие группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции убихитина 1 (EXP), анализировали, как описано выше, и каждую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции («EXP») также разделяли на

соответствующие промоторы, лидерные последовательности и интроны, составляющие каждую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции. Последовательности идентифицированных групп экспрессионных элементов регуляции транскрипции убихитина 1 («EXP») представлены в настоящем описании как SEQ ID NO: 1, 5, 7, 9 и 11, и перечислены ниже в таблице 1. Соответствующие промоторы убихитина 1 представлены в настоящем описании как SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 и 12. Лидерная последовательность и интрон убихитина 1 представлены в настоящем описании как SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно.

Последовательности, кодирующие другие группы экспрессионных элементов регуляции транскрипции *Cucumis* или последовательности EXP, которые состоят из промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу; или промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу и к интронному элементу; или промоторного элемента, функционально присоединенного к лидерному элементу, функционально присоединенному к интронному элементу, функционально присоединенному к лидерному элементу представлены как SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 162, 167, 168, 172, 175, 176, 177, 178, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 211 и 212, и также перечислены ниже в таблице 1. Дополнительные промоторные элементы представлены как SEQ ID NO: 163 и 169. Дополнительные лидерные элементы представлены как SEQ ID NO: 164, 166 и 170. Дополнительные интронные элементы представлены как SEQ ID NO: 165 и 171. Элементы, в которых промотор

функционально присоединен к лидерному элементу, представлены как SEQ ID NO: 157, 160, 173, 179 и 186. Элементы, в которых интрон функционально присоединен к лидерному элементу, представлены как SEQ ID NO: 158, 161, 174, 180 и 187. Что касается субсерии последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 13 - 199, 211 и 212, то эти последовательности были отобраны и клонированы, исходя из результатов экспериментов, таких как определение профиля или экспрессии транскрипта, запускаемой промоторами гомологичных генов различных видов, предположительно, с желательными профилями экспрессии, такими как конститутивная экспрессия, экспрессия в корнях, экспрессия в надземных частях растения или экспрессия в семенах. Фактическая активность, сообщаемая последовательностями *Cucumis,* была определена эмпирически, и она необязательно должна быть идентична активности регуляторного элемента, происходящего от гомологичного гена вида, не принадлежащего к *Cucumis melo*, при его использовании в клетке трансформированного растения-хозяина или в целом трансгенном растении.

Таблица 1

Группы экспрессионных элементов регуляции транскрипции, промоторы, лидерные последовательности и интроны, выделенные из *Cucumis melo*

Аннотация	SEQ ID NO:	Описание	Тип композиции	Размер (п.н.)	Композиция	Координаты элементов в EXP
EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	Убихитин 1	EXP	2611	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-2068;2069-2150;2151-2608
P-CUCme.Ubq1-1:1:15	2	Убихитин 1	P	2068	Промотор	
L-CUCme.Ubq1-1:1:1	3	Убихитин 1	L	82	Лидерная последовательность	
I-CUCme.Ubq1-1:1:1	4	Убихитин 1	I	461	Интрон	
EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	Убихитин 1	EXP	2002	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-1459;1460-1541;1542-1999
P-CUCme.Ubq1-1:1:16	6	Убихитин 1	P	1459	Промотор	
EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	Убихитин 1	EXP	1507	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-964;965-1046;1047-1504
P-CUCme.Ubq1-1:1:17	8	Убихитин 1	P	964	Промотор	

EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	Убихитин 1	EXP	1022	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-479;480-561;562-1019
P-CUCme.Ubq1-1:1:18	10	Убихитин 1	P	479	Промотор	
EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	Убихитин 1	EXP	716	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-173;174-255;256-713
P-CUCme.Ubq1-1:1:19	12	Убихитин 1	P	173	Промотор	
P-CUCme.1-1:1:1	13	Фосфотаза 2A	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	Обратный комплемент; см. SEQ ID NO:155
P-CUCme.2-1:1:1	14	Актин 1	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-964;965-1028;1029-1991;1992-2003
P-CUCme.3-1:1:3	15	Актин 2	EXP	1990	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1243;1244-1319;1320-1982;1983-1990

P-CUCme.4-1:1:2	16	Убихитин 2	EXP	2005	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1646;1647-1704;1705-2005;2006-2008
P-CUCme.5-1:1:2	17	Убихитин 3	EXP	2004	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-748;749-819;820-2004
P-CUCme.6-1:1:1	18	Бета-цепь тубулина	EXP	1935	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1436;1437-1482;1483-1919;1920-1935
P-CUCme.8-1:1:2	19	Бета-цепь тубулина	EXP	1606	Промотор; лидерная последовательность	1-1527;1528-1606
P-CUCme.9-1:1:2	20	Бета-цепь тубулина	EXP	1487	Промотор; лидерная последовательность	1-1384;1385-1487
P-CUCme.10-1:1:1	21	Бета-цепь тубулина	EXP	1448	Промотор; лидерная последовательность	1-1363;1364-1448
P-CUCme.11-1:1:2	22	Фактор элонгации 1-альфа	EXP	1235	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-617;618-677;678-1213;1214-1235

P-CUCme.15-1:1:2	23	Фактор элонгации 1-альфа	EXP	2003	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1330;1331-1435;1430-1975;1976-2002
P-CUCme.16a-1:1:2	24	Убихитин 7	EXP	2015	Промотор; лидерная последовательность	
P-CUCme.16b-1:1:1	25	Убихитин 6	EXP	2006	Промотор; лидерная последовательность	
P-CUCme.17-1:1:2	26	Убихитин-40S-рибосомный белок S27a	EXP	2017	Промотор; лидерная последовательность	1-1969;1970-2017
P-CUCme.18-1:1:2	27	Убихитин-40S-рибосомный белок S27a	EXP	1353	Промотор; лидерная последовательность	1-1308;1309-1353
P-CUCme.19-1:1:2	28	Хлорофилл a/b-связывающий белок	EXP	2005	Промотор; лидерная последовательность	1-1960;1961-2005
P-CUCme.20-1:1:2	29	Хлорофилл a/b-связывающий белок	EXP	1445	Промотор; лидерная последовательность	1-1390;1391-1445
P-CUCme.21-1:1:1	30	Хлорофилл a/b-связывающий белок	EXP	1282	Промотор; лидерная последовательность	1-1233;1234-1282
P-CUCme.22-1:1:3	31	Фактор элонгации 4-альфа	EXP	2002		

P-CUCme.24-1:1:2	32	S-аденозилметионин-синтетаза	EXP	2003	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1067;1068-1165;1166-2001;2002-2003
P-CUCme.26-1:1:2	33	Белок чувствительности к стрессу	EXP	1372	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-577;578-654;655-1366;1367-1372
P-CUCme.28-1:1:2	34	Рибосомный белок S5a	EXP	1122		
P-CUCme.29-1:1:2	35	Рибосомный белок S5a	EXP	2017	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-490;491-571;572-2012;2013-2017
CumMe_WSM_SF143981.G5150	36	LHCB6 (СВЕТОУЛАВЛИВАЮ-ЩИЙ КОМПЛЕКС PSII, СУБЪЕДИНИЦА 6)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF144839.G5080	37	Фактор инициации трансляции Гамма EIF2	EXP	1760		
CumMe_WSM_SF146040.G5050	38	Фактор инициации трансляции EIF2	EXP	1767		

CumMe_WSM_SF16408.G5350	39	Фактор элонгации Tu	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF16429.G5670	40	Неизвестный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF16444.G5140	41	Гистон H4	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1947;1948-2000
CumMe_WSM_SF16530.G6000	42	Фактор транскрипции HMGB2 (Группа 2 с высокой подвижностью)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF16553.G5090	43	PBG1; эндопептидаза треонинового типа	EXP	1115		
CumMe_WSM_SF16563.G5560	44	ATARFBIA (ADP-рибозилирующий фактор BIA)	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1329;1330-1427;1428-1988;1989-2000
CumMe_WSM_SF16675.G5720	45	Семейство хроматиновых белков	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF16920.G5650	46	CSD1 (медь/цинк-супероксид-дисмутаза 1)	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF16953.G5180	47	SCE1 (Конъюгирующий фермент SUMO 1); лигаза SUMO	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17051.G5470	48	60S-рибосомный белок L9 (RPL90D)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17111.G5790	49	Комплекс «убихинол-цитохром С-редуктаза убихинон-связывающий белок	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1895;1896-2000
CumMe_WSM_SF17142.G5920	50	Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза; хлоропласт	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17190.G6200	51	PRK (фосфорибулокиназа)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17250.G5910	52	LHCB5 (Светоулавливающий комплекс фотосистемы II.5)	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF17252.G7330	53	Домен-содержащий белок комплекса, ассоциированного с полипептидом с растущей цепью (NAC)	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-1195;1196-1297;1298-2000
CumMe_WSM_SF17253.G5150	54	RPS9 (рибосомный белок S9)	EXP	1547		
CumMe_WSM_SF17322.G5110	55	Рибосомный белок 60S L22 (RPL22A)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17349.G5770	56	PGRL1B (PGR5-подобный B)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17357.G5630	57	Рибосомный белок 40S S10 (RPS10B)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17494.G5140	58	MEE34 (Белок 34, ответственный за прекращение функционирования эмбриона плода)	EXP	1591		
CumMe_WSM_SF17524.G6410	59	SUS2 (аномальный суспенсор 2)	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF17672.G5610	60	PSAK (субъединица K фотосистемы I)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17773.G6620	61	Белок, содержащий C-концевой домен аконитазы	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF17866.G6050	62	ATPDIL5-1 (PDI-подобный 5-1)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18004.G6600	63	Белок, принадлежащий к семейству гликопротеинов, богатых гидроксипролином	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18045.G6670	64		EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18053.G5410	65	Эндомембранный белок 70	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18287.G5380	66	CP12-1	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18488.G5340	67	Кафеоил-CoA-3-O-метилтрансфераза	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1923;1924-2000
CumMe_WSM_SF18504.G5090	68	Белок, принадлежащий к семейству субъединиц H АТР-синтазы вакуоля	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF18530.G5750	69	GUN5 (НЕ СЦЕПЛЕННЫЙ С ГЕНОМОМ 5); магний-хелатаза	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18536.G6480	70	MBF1A (ФАКТОР, СВЯЗАННЫЙ МОСТИКОВЫМИ СВЯЗЯМИ СО МНОЖЕСТВОМ БЕЛКОВ 1A), ко-активатор транскрипции	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18575.G6410	71	Неизвестный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18634.G5190	72	60S-рибосомный белок L23 (RPL23A)	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1971;1972-2000
CumMe_WSM_SF18645.G5380	73	GS2 (ГЛУТАМИН-СИНТЕТАЗА 2)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18716.G5860	74	40S-рибосомный белок S12 (RPS12A); обратный комплемент; индуцированный ауксином x10A-подобный белок	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	Обратный комплемент, см. SEQ ID NO:184

CumMe_WSM_SF18801.G5040	75		EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18806.G6220	76	Неизвестный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18850.G5630	77	PAC1; эндопептидаза треонинового типа	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18863.G7550	78	Гамма-цепь ATP-синтазы митохондрий (ATPC)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF18986.G6110	79	GER1 (гермин-подобный белок 1); оксалат-оксидаза	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF19064.G5690	80	Гистон H3:2	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-1581;1582-1670;1671-2000
CumMe_WSM_SF19323.G5120	81	Предполагаемый GTP-связывающий белок внешней оболочки хлоропластов	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF19452.G5090	82	Предполагаемая глюкан-фосфорилаза	EXP	1072		
CumMe_WSM_SF19631.G5170	83	Предполагаемая активаза RuBisCO	EXP	1730		

CumMe_WSM_SF19647.G5760	84	Белок, принадлежащий к семейству 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-936;937-1021;1022-1992;1993-2000
CumMe_WSM_SF19839.G5090	85	ATPDX1.1 (белок биосинтеза пиридоксина 1.1)	EXP	1020	Промотор; лидерная последовательность	1-928;929-1020
CumMe_WSM_SF19850.G5130	86	Фактор транскрипции HMGB2 (группа B2 с высокой степенью подвижности)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF19902.G5260	87	Белок, принадлежащий к семейству универсальных белков стресса (USP)/ранний белок, принадлежащий к семейству нодулина ENOD18	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF19992.G6100	88	Неизвестный белок	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF20132.G5560	89	Пероксидаза 21	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1962;1963-2000
CumMe_WSM_SF20147.G7910	90	CSD1 (МЕДЬ/ЦИНК-СУПЕРОКСИД-ДИСМУТАЗА 1)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20355.G5130	91	Семейство ATP-синтаз	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20359.G5870	92	Митохондриальная NADH-убихинон-оксидоредуктаза, 20 кДа-субъединица	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20368.G5700	93	PGR5 (белок регуляции протонного градиента)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20409.G5240	94	Фактор элонгации 1B, альфа-субъединица 1 (eEF1Balpha1)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20431.G6340	95	DHS2 (3-дезокси-D-арабино-гептулозонат-7-фосфатсинтаза)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20505.G5440	96	THIS (тиамин C); ADP-рибозо-пирофосфогидролаза	EXP	1373		

CumMe_WSM_SF20509.G5920	97	Y14; РНК-связывающий белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF206458.G5970	98	FAD2 (ЖИРНАЯ КИСЛОТА-ДЕЗАТУРАЗА 2)	EXP	2000	Промотор	1-2000
CumMe_WSM_SF206534.G5200	99	Неизвестный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF20997.G6990	100	ALD1 (AGD2-ПОДОБНЫЙ БЕЛОК, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ЗАЩИТНУЮ РЕАКЦИЮ)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF21035.G5090	101	Натрий/кальций Белок, принадлежащий к семейству ионообменников	EXP	1078		
CumMe_WSM_SF21117.G5370	102	Предполагаемый 30S-рибосомный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF21141.G5630	103	40S-рибосомный белок S24 (RPS24A)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF21198.G5180	104		EXP	1974		

CumMe_WSM_SF21366.G5980	105	GRF12 (ОБЩИЙ ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ 12)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF21828.G5150	106	cpHsc70-1 (хлоропластный белок теплового шока 70-1)	EXP	1643		
CumMe_WSM_SF21886.G5080	107	NPQ4 (НЕФОТОХИМИЧЕСКИЙ ГАСЯЩИЙ БЕЛОК AL)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22008.G5670	108	NAP1;2 (БЕЛОК, УЧАСТВУЮЩИЙ В СБОРКЕ НУКЛЕОСОМ 1;2)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22070.G5280	109	Предполагаемая фруктозо-фосфат-альдолаза	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22097.G5540	110	APX3 (АСКОРБАТ-ПЕРОКСИДАЗА 3)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22254.G5760	111	40S-рибосомный белок S7 (RPS7B)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22275.G5780	112	Белок, принадлежащий к семейству рибосомных белков L17	EXP	1027		

CumMe_WSM_SF22355.G5310	113		EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22531.G5120	114	Предполагаемый эукариотический фактор инициации трансляции 1A	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-759;760-858;859-1979;1980-2000
CumMe_WSM_SF22870.G5370	115	ATSARA1A (БЕЛОК, ПРИНАДЛЕЖАЩИЙ К СУПЕРСЕМЕЙСТВУ БЕЛКОВ RAS, СЕКРЕТИРУЮЩИХСЯ В РАСТЕНИИ ARABIDOPSIS THALIANA)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF22934.G5290	116	Предполагаемая субъединица T-комплексного белка 1 эпсилон	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF23181.G5100	117	CEV1 (БЕЛОК КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ VSP-1)	EXP	1025		

CumMe_WSM_SF23186.G6160	118	Предполагаемый 14 кДа-белковый комплекс убихинол-цитохром С-редуктазы	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF23397.G5210	119	RPL27 (КРУПНАЯ СУБЪЕДИНИЦА РИБОСОМНОГО БЕЛКА 27)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF23760.G5200	120	NDPK1: ATP-связывающаяся нуклеотид-дифосфат-киназа	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1901;1902-2000
CumMe_WSM_SF23906.G6180	121	PSBX (субъединица X фотосистемы II)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF24040.G5450	122	RPS17 (РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S17)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF24045.G5400	123	EXL3 (EXORDIUM-ПОДОБНЫЙ БЕЛОК 3)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF24117.G5600	124	60S Рибосомный белок L26 (RPL26A)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF25084.G5580	125		EXP	2000		

CumMe_WSM_SF25141.G5160	126	Предполагаемая изоцитрат-дегидрогеназа	EXP	1397	Промотор; лидерная последовательность	1-1322;1323-1397
CumMe_WSM_SF25355.G5000	127	LOS1; фактор элонгации трансляции, связывающийся с ионами меди	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность; CDS	1-734;735-811;812-1340;1341-1360;1361-2000
CumMe_WSM_SF25370.G5000	128	PSBP-1 (СУБЪЕДИНИЦА ФОТОСИСТЕМЫ II P-1)	EXP	1657		
CumMe_WSM_SF25455.G5370	129	GLY3 (ГЛИОКСИЛАЗА II-3)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF25936.G5450	130	Митохондриальный белок, принадлежащий к семейству субстратов-носителей	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1878;1879-2000
CumMe_WSM_SF27080.G5510	131	L1P1 (ЛИПОЕВАЯ КИСЛОТА-СИНТАЗА 1)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF27222.G5150	132	DRT112; электрон-носитель, связывающийся с ионами меди	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF27957.G5450	133	SMAP1 (НЕБОЛЬШОЙ КИСЛОТНЫЙ БЕЛОК 1)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF28729.G5340	134	Предполагаемый РНК-связывающий белок cp29	EXP	1696		
CumMe_WSM_SF28805.G6200	135	Неизвестный белок	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF31264.G5380	136	ATPH1 (ГОМОЛОГ ПЛЕКСТРИНА 1 РЕЗУШКИ ТАЛЯ)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF35856.G5150	137	TIP4;1 (внутренний белок тонопластов 4;1)	EXP	1575		
CumMe_WSM_SF40859.G5250	138	SMT2 (СТИРОЛ-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА 2)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF41124.G5080	139	40S-рибосомный белок S2 (RPS2C)	EXP	1006	Промотор; лидерная последовательность	1-883;884-1006
CumMe_WSM_SF41128.G5410	140	CRY2 (КРИПТОХРОМ 2)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF41254.G5160	141	GDP-D-глюкозо-фосфорилаза	EXP	1556		
CumMe_WSM_SF41588.G5470	142	PRPL11 (РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК ПЛАСТИДА L11)	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF41644.G6400	143	SHD (БЕЛОК КОРОВЯКА)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF41983.G5000	144	Каталитический белок/белок, связывающийся с коферментом	EXP	1337		
CumMe_WSM_SF42075.G5100	145	CPN60B (ШАПЕРОНИН 60 БЕТА)	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF42141.G5110	146	Предполагаемая цистеин-протеаза, подобная катепсину B	EXP	1212		
CumMe_WSM_SF44933.G5290	147	EBF1 (EIN3-связывающий белок F бокса 1), убихитин-протеинлигаза	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF44977.G5000	148	PAP26 (пурпурная кислая фосфатаза 26)	EXP	1254		
CumMe_WSM_SF45441.G5510	149	GAPA-2 (СУБЪЕДИНИЦА 2 ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ A)	EXP	2000		

CumMe_WSM_SF45882.G5120	150	Предполагаемая фруктозо-1,6-бисфосфатаза	EXP	1680		
CumMe_WSM_SF47806.G5070	151	Митохондриальная цепь АТР-синтазы эпсилон	EXP	1524		
CumMe_WSM_SF53106.G5190	152	CPN60A (ШАПЕРОНИН-60 АЛЬФА)	EXP	1851		
CumMe_WSM_SF65588.G5230	153	Белок, родственный белку, связывающемуся с кальцием в вакуоли	EXP	2000		
CumMe_WSM_SF9060.G5120	154	APE2 (БЕЛОК ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, УЧАСТВУЮЩИЙ В ФОТОСИНТЕЗЕ 2)	EXP	1288		
P-CUCme.1-1:1:1rc	155	Фосфотаза 2A	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1135;1136-1249;1250-1990;1991-2000
EXP-CUCme.4:1:1	156	Убихитин 2	EXP	2011	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1646;1647-1704;1705-2005;2006-2008

P-CUCme.4-1:1:4	157	Убихитин 2	P;L	1698	Промотор; лидерная последовательность	
I-CUCme.4-1:1:1	158	Убихитин 2	I;L	313	Интрон; лидерная последовательность	
EXP-CUCme.5:1:1	159	Убихитин 3	EXP	2010	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-748;749-819;820-2004;2005-2007
P-CUCme.5-1:1:3	160	Убихитин 3	P;L	1107	Промотор; лидерная последовательность	
I-CUCme.5-1:1:1	161	Убихитин 3	I;L	903	Интрон; лидерная последовательность	
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	Фактор элонгации 1-альфа	EXP	1235	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-617;618-677;678-1213;1214-1235
P-CUCme.eEF1a-1:1:1	163	Фактор элонгации 1-альфа	P	617	Промотор	
L-CUCme.eEF1a-1:1:1	164	Фактор элонгации 1-альфа	L	54	Лидерная последовательность	
I-CUCme.eEF1a-1:1:1	165	Фактор элонгации 1-альфа	I	545	Интрон	

L-CUCme.eEF1a-1:1:2	166	Фактор элонгации 1-альфа	L	19	Лидерная последовательность	
P-CUCme.19-1:1:3	167	Хлорофилл a/b-связывающий белок	EXP	2003	Промотор; лидерная последовательность	1-1958;1959-2003
EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	S-аденозилметионин-синтетаза	EXP	2004	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-1067;1068-1165;1166-2003
P-CUCme.SAMS2-1:1:1	169	S-аденозилметионин-синтетаза	P	1067	Промотор	
L-CUCme.SAMS2-1:1:1	170	S-аденозилметионин-синтетаза	L	92	Лидерная последовательность	
I-CUCme.SAMS2-1:1:1	171	S-аденозилметионин-синтетаза	I	845	Интрон	
EXP-CUCme.29:1:1	172	Рибосомный белок S5a	EXP	2018	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-490;491-571;572-2012;2013-2018
P-CUCme.29-1:1:4	173	Рибосомный белок S5a	P;L	565	Промотор; лидерная последовательность	
I-CUCme.29-1:1:1	174	Рибосомный белок S5a	I;L	1453	Интрон; лидерная последовательность	

P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1	175	Гистон H4	EXP	1999	Промотор; лидерная последовательность; интрон	1-1946;947-1999
P-CUCme.CumMe_WSM_SF16563.G5560-1:1:1	176	ATARFBIA (ADP-рибозилирующий фактор BIA)	EXP	2004	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1331;1332-1429;1430-1992;1993-2004
P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1	177	Комплекс «убихинол-цитохром C-редуктаза; убихинон-связывающий белок	EXP	2005	Промотор; лидерная последовательность	1-1901;1902-2005
EXP-CumMe.WSM_SF17252.G7330:1:1	178	Домен-содержащий белок комплекса, ассоциированного с полипептидом с растущей цепью (NAC)	EXP	1978	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1167;1168-1269;1270-1972;1973-1975
P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	Домен-содержащий белок комплекса, ассоциированного с полипептидом с растущей цепью (NAC)	P;L	1263	Промотор; лидерная последовательность	

I-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	180	Домен-содержащий белок комплекса, ассоциированного с полипептидом с растущей цепью (NAC)	I;L	715	Интрон; лидерная последовательность	
P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1	181	Кафеоил-CoA-3-O-метилтрансфераза	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-923;1924-2000
P-CUCme.CumMe_WSM_SF18536.G6480-1:1:1	182	MBF1A (фактор, связанный мостиковыми связями со множеством белков 1A), ко-активатор транскрипции	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность; интрон	
P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1	183	60S-рибосомный белок L23 (RPL23A)	EXP	1989	Промотор; лидерная последовательность	1-1960;1961-1989
P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	Индуцированный ауксином x10A-подобный белок	EXP	1463	Промотор; лидерная последовательность	1-1392;1393-1463

EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1	185	Гистон H3.2	EXP	2006	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-1581;1582-1670;1671-2000;2001-2003
P-CUCme.WSM_SF19064.G5690-1:1:1	186	Гистон H3.2	P;L	1664	Промотор; лидерная последовательность	
I-CUCme.WSM_SF19064.G5690-1:1:1	187	Гистон H3.2	I;L	342	Интрон; лидерная последовательность	
P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1	188	Белок, принадлежащий к семейству 6-фосфоглюконат-дегидрогеназ	EXP	2003	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-939;940-1024;1025-1995;1996-2003
P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	ATPDX1.1 (белок биосинтеза пиридоксина 1.1)	EXP	1024	Промотор; лидерная последовательность	1-904;905-1024
P-CUCme.CumMe_WSM_SF20132.G5560-1:1:1	190	Пероксидаза 21	EXP	2001	Промотор; лидерная последовательность	1-1962;1963-2001

P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 06458.G5970-1:1:1	191	FAD2 (жирная кислота-дезатураза 2)	EXP	4175	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-2171;2172-2325;2326-4155;4156-4175
P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 2531.G5120-1:1:1	192	Предполагаемый эукариотический фактор инициации трансляции 1A	EXP	1999	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-759;760-858;859-1978;1979-1999
P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 3760.G5200-1:1:1	193	NDPK1: ATP-связывающаяся нуклеотид-дифосфат-киназа	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	1-1901;1902-2000
P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 3906.G6180-1:1:1	194	PSBX (субъединица X фотосистемы II)	EXP	2000	Промотор; лидерная последовательность	
P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 5141.G5160-1:1:2	195	Предполагаемая изоцитрат-дегидрогеназа	EXP	1400	Промотор; лидерная последовательность	1-1325;1326-1400

P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 5355.G5000-1:1:1	196	LOS1; фактор элонгации трансляции, связывающийся с ионами меди	EXP	2019	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность; CDS	1-734;735-811;812-1340;1341-1360;1361-2019
P-CUCme.CumMe_WSM_SF2 5936.G5450-1:1:1	197	Митохондриальный белок, принадлежащий к семейству субстратов-носителей	EXP	1999	Промотор; лидерная последовательность	1-1877;1878-1999
P-CUCme.CumMe_WSM_SF3 5856.G5150-1:1:1	198	TIP4;1 (внутренний белок тонопластов 4;1)	EXP	1578		
P-CUCme.CumMe_WSM_SF4 1124.G5080-1:1:1	199	40S-рибосомный белок S2 (RPS2C)	EXP	1023	Промотор; лидерная последовательность	1-945;946-1023
P-CUCme.20-1:3	211	Хлорофилл a/b-связывающий белок	EXP	1446	Промотор; лидерная последовательность	1-1390;1391-1446
EXP-CUCme.29:1:2	212	Рибосомный белок S5a	EXP	2018	Промотор; лидерная последовательность; интрон; лидерная последовательность	1-490;491-571;572-2011;2013-2018

Как показано в таблице 1, например, группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP), обозначенная EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), с компонентами, выделенными из *C. melo*, содержит промоторный элемент размером 2068 пар оснований (п.о.), P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2), функционально присоединенный к 5′-концу лидерного элемента, L-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 3), функционально присоединенного к 5′-концу интронного элемента, I-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 4). Группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP), обозначенная EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5), с компонентами, выделенными из *C. melo*, содержит промоторный элемент размером 1459 пар оснований (п.о.), P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6), функционально присоединенный к 5′-концу лидерного элемента, L-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 3), функционально присоединенного к 5′-концу интронного элемента, I-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 4). Группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP), обозначенная EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7), с компонентами, выделенными из *C. melo*, содержит промоторный элемент размером 964 пар оснований (п.о.), P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8), функционально присоединенный к 5′-концу лидерного элемента, L-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 3), функционально присоединенного к 5′-концу интронного элемента, I-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 4). Группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP), обозначенная EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9), с компонентами, выделенными из *C. melo*, содержит промоторный элемент размером 479 пар оснований (п.о.), P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10), функционально присоединенный к 5′-концу лидерного элемента, L-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 3), функционально присоединенного к 5′-концу интронного элемента, I-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 4). Группа экспрессионных элементов регуляции транскрипции (EXP), обозначенная EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11), с компонентами, выделенными из *C. melo*, содержит промоторный элемент размером 173 пары оснований (п.о.), P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12), функционально присоединенный к 5′-концу лидерного элемента, L-

CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 3), функционально присоединенного к 5′-концу интронного элемента, I-CUCme.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 4).

Выравнивание промоторных последовательностей убихитина 1 проиллюстрировано на фиг. 1a-1f. Промоторные элементы, P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6), P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8), P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10) и P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12) были сконструированы путем введения делеций различной длины у 5′-конца промотора, P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2).

Пример 2: Анализ регуляторных элементов, запускающих GUS в протопластах семядоли сои

Протопласты семядоли сои трансформировали растительными экспрессионными векторами, содержащими тестируемую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и их экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в протопластах листьев, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами.

Экспрессию трансгена, запускаемую EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5), EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7), EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9) и EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11), сравнивали с экспрессией, запускаемой известными конститутивными промоторами. Каждый экспрессионный вектор растения состоял из правой граничной области *Agwbacterium tumefaciens*; первого трансгенного кластера, который состоял из последовательности EXP или известного конститутивного промотора, функционально присоединенного к 5′-концу последовательности, кодирующей β-глюкуронидазу (GUS, SEQ ID NO: 206), содержащую процессируемый интрон, происходящий от свето-индуцируемого тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), и функционально присоединенного к 5′-концу 3′-области терминации гена E6 *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 204), гена RbcS2-E9 *Pisum sativum* (T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6, SEQ ID NO: 203), или гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2-1:1:1,

SEQ ID NO: 205); второго селективного трансгенного кластера, используемого для отбора трансформированных клеток растений и сообщающего резистентность к гербициду глифосату (инициируемую промотором актина 7 *Arabidopsis*) или резистентность к антибиотику канамицину; и левой граничной области *A. tumefaciens*. Контрольный экспрессионный вектор растения, не содержащий промотора (pMON124912), служил в качестве негативного контроля для экспрессии. Вышеупомянутые тестируемые и конститутивные группы экспрессионных элементов клонировали в растительные экспрессионные векторы, указанные ниже в таблице 2.

Таблица 2

Растительные экспрессионные векторы и соответствующая группа экспрессионных элементов и 3'-UTR

Экспрессионный вектор	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	3'-UTR
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON124912	Без промотора		T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON138777	EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON138779	EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON138780	EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	T-Gb.FbL2-1:1:1

Были также сконструированы две плазмиды, используемые для ко-трансформации и нормализации данных. Одна из контрольных плазмид для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу светляка (*Photinus pyralis*) (FLuc, SEQ ID NO: 207) и функционально присоединенной к 5'-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.NO-1:1:13, SEQ ID NO: 209). Другая контрольная плазмида для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу фиалки трехцветной (*Renilla reniformis*) (RLuc, SEQ ID NO: 208), и функционально

присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*.

Растительные экспрессионные векторы pMON80585, pMON109584, pMON118756, pMON124912, pMON138776, pMON138777, pMON138778, pMON138779 и pMON138780 были использованы для трансформации клеток протопластов семядоли сои с применением методов ПЭГ-трансформации. Клетки протопластов трансформировали эквимолярными количествами каждой из двух трансформирующих контрольных плазмид для трансформации и экспрессионным растительным тест-вектором. Затем анализировали GUS-активность и люциферазную активность. Оценку активности GUS и люциферазы осуществляли путем введения аликвот препаратов лизированных клеток, трансформированных, как описано выше, в два различных планшета с небольшими лунками. Один планшет использовали для оценки GUS, а второй планшет использовали для проведения двойного люциферазного анализа с использованием системы для двойного анализа с люциферазным репортером (Promega Corp., Madison, WI; см., например, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). Оценку образца на трансформацию проводили с 3 или 4 повторами. Средние величины для GUS и люциферазы представлены ниже в таблице 3.

Таблица 3

Средние величины уровней экспрессии GUS и люциферазы и отношения GUS/люцифераза

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Средняя величина GUS	Средняя величина FLuc	Средняя величина RLuc	GUS/ FLuc	GUS/ RLuc
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	55173	6498	30503	8,49	1,81
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	200	24940	5050,75	35495	4,94	0,70
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	201	9871	6880	40850	1,43	0,24
pMON124912	Без промотора		2000	11670	73187	0,17	0,03
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	26972	6467,25	37200	4,17	0,73
pMON138777	EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	41307	5902,5	24396	7,00	1,69
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	90140	10710,5	60983	8,42	1,48
pMON138779	EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	35526	5590	28001	6,36	1,27
pMON138780	EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	23298	4483,25	19075	5,20	1,22

Для сравнения относительной активности каждого промотора в

протопластах семядоли сои, величины GUS выражали как отношение GUS-активности к люциферазной активности, и нормализовали по уровням экспрессии, наблюдаемым для группы конститутивных экспрессионных элементов, EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже, в таблице 4 представлены отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже, в таблице 5 представлены отношения GUS:люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3.

Таблица 4

Отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	5,92	1,72
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	3,44	1,00
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,00	0,29
pMON124912	Без промотора		0,12	0,03
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	2,91	0,84
pMON138777	EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	4,88	1,42
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	5,87	1,70
pMON138779	EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	4,43	1,29
pMON138780	EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	3,62	1,05

Таблица 5

Отношения GUS: люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/ RLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/ RLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	7,49	2,57
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	2,91	1,00
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,00	0,34
pMON124912	Без промотора		0,11	0,04
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	3,00	1,03
pMON138777	EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	7,01	2,41
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	6,12	2,10
pMON138779	EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	5,25	1,81
pMON138780	EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	5,05	1,74

Как показано выше в таблицах 4 и 5, каждая группа экспрессионных элементов EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5), EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7), EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9) и EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11) обладала способностью запускать экспрессию трансгена в протопластах семядоли сои. Уровни экспрессии были выше, чем уровни экспрессии EXP-At.Act7:1:11, и в этом анализе, они в 2,9-5,8 раз (FLuc) или в 3-7 раз (RLuc) превышали уровни экспрессии EXP-At.Act7:1:11. Уровни экспрессии были эквивалентны или превышали уровни экспрессии, наблюдаемые для EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Уровни экспрессии в 0,8-1,7 раз

(FLuc) или в 1-2,4 раза (RLuc) превышали уровни экспрессии, наблюдаемые для EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3.

Пример 3: Анализ регуляторных элементов, инициирующих GUS в листьях и корнях сои, бомбардированных частицами

Листья и корни сои были трансформированы растительными экспрессионными векторами, содержащими тестируемую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и их экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в корнях и листьях, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами.

Экспрессию трансгена, запускаемую EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5), EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7), EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9) и EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11), сравнивали с экспрессией, запускаемой известными конститутивными промоторами в листьях и корнях сои, бомбардированных частицами. Растительные экспрессионные векторы, используемые для трансформации листьев и корней, были аналогичны векторам, указанным в таблице 2 описанного выше примера 2.

Растительные экспрессионные векторы, pMON80585, pMON109584, pMON118756, pMON124912, pMON138776, pMON138777, pMON138778, pMON138779 и pMON138780 использовали для трансформации листьев и корней сои методами трансформации посредством бомбардировки частицами.

Вкратце, поверхность семян сои A3244 стерилизовали и проращивали в планшетах с фотопериодом 16 часов - день и 8 часов - ночь. Приблизительно через 13 дней, из рассады собирали ткани листьев и корней в стерильных условиях, и эти ткани использовали для бомбардировки частицами. Образцы ткани произвольно распределяли по чашкам Петри, содержащим среду для культивирования растений. Десять микрограммов плазмидной ДНК использовали для покрытия золотыми частицами 0,6 микрон (Catalog #165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) в целях бомбардировки. Макроносители нагружали ДНК-покрытыми золотыми частицами (Catalog #165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Для

трансформации использовали биобаллистическое «ружье» PDS 1000/He (Catalog #165-2257 Bio-Rad, Hercules CA). Бомбардированные ткани корней и листьев оставляли на 24 часа в темноте при 26°C для инкубирования. После инкубирования в течение ночи, ткани окрашивали в растворе для экспрессии GUS в течение ночи при 37°C. После окрашивания в течение ночи, ткани погружали на ночь в 70% этанол для удаления хлорофилла и для проведения анализа на GUS-окрашивание. Затем ткани фотографировали и каждой конструкции присваивали оценки «0», «+» - «++++++», в зависимости от уровня экспрессии GUS (0 - отсутствие экспрессии, «+» - «++++++» - от низкого до высокого уровня экспрессии, соответственно).

Под экспрессией трансгена GUS, обнаруженной в каждой ткани, подразумевается относительный потенциальный уровень и специфичность каждого элемента в отношении способности каждого элемента инициировать экспрессию трансгена в стабильно трансформированных растениях кукурузы. Средние оценки уровней экспрессии GUS представлены ниже в таблице 6.

Таблица 6

Оценки экспрессии GUS в листьях и корнях, бомбардированных частицами

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Оценка экспрессии в листьях	Оценка экспрессии в корнях
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	++++	++
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	+++++	+++
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	++++	++
pMON124912	Без промотора		0	0
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	++++	+++
pMON138777	EXP-CUCme.Ubq1:1:2	5	+++	++
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	+++	++
pMON138779	EXP-CUCme.Ubq1:1:4	9	+++	++
pMON138780	EXP-CUCme.Ubq1:1:5	11	++	+

Как показано выше в таблице 6, каждая группа экспрессионных элементов EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubq1:1:2 (SEQ ID NO: 5), EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7), EXP-CUCme.Ubq1:1:4 (SEQ ID NO: 9) и EXP-CUCme.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 11) обладала способностью запускать экспрессию трансгена в трансформированных тканях листьев и корней, бомбардированных частицами.

Пример 4: Анализ регуляторных элементов, запускающих GUS в протопластах семядоли сои

Протопласты семядоли сои трансформировали растительными экспрессионными векторами, содержащими тестируемую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и их экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в протопластах листьев, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами.

Экспрессию трансгена, запускаемую P-CUCme.1-1:1:1rc (SEQ ID NO:155), P-CUCme.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 14), P-CUCme.3-1:1:3 (SEQ ID NO: 15), EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), EXP-CUCme.5:1:1 (SEQ ID NO: 159), P-CUCme.6-1:1:1 (SEQ ID NO: 18), P-CUCme.8-1:1:2 (SEQ ID NO: 19), P-CUCme.9-1:1:2 (SEQ ID NO: 20), P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme. 16a-1:1:2 (SEQ ID NO: 24), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), P-CUCme.21-1:1:1 (SEQ ID NO: 30), P-CUCme.22-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), P-CUCme.26-1:1:2 (SEQ ID NO: 33), P-CUCme.28-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) и EXP-CUCme.29:1:2 (SEQ ID NO: 212), сравнивали с экспрессией, запускаемой известными группами конститутивных экспрессионных элементов. Каждый экспрессионный вектор растения состоял из правой граничной области *Agwbacterium tumefaciens*; первого трансгенного кластера, который состоял из тест-промотора или известного конститутивного промотора, функционально присоединенного к 5′-концу последовательности, кодирующей β-глюкуронидазу (GUS, SEQ

ID NO: 206), содержащую процессируемый интрон, происходящий от свето-индуцируемого тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753) и функционально присоединенный к 5′-концу 3'-области области терминации гена E6 *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 204), гена RbcS2-E9 *Pisum sativum* (T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6, SEQ ID NO: 203) или гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2-1:1:1, SEQ ID NO: 205); второго селективного трансгенного кластера, используемого для отбора трансформированных клеток растений и сообщающего резистентность к гербициду глифосату (запускаемую промотором актина 7 *Arabidopsis*) или резистентность к антибиотику канамицину; и левой граничной области *A. tumefaciens*. Контрольный экспрессионный вектор растения, не содержащий промотора (pMON124912), служит в качестве негативного контроля для экспрессии. Вышеупомянутые тестируемые и конститутивные группы экспрессионных элементов клонировали в растительные экспрессионные векторы, указанные ниже в таблице 7.

Таблица 7

Растительные экспрессионные векторы и соответствующая группа экспрессионных элементов и 3'-UTR

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	3'-UTR
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON124912	Без промотора		T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	T-Gb.FbL2-1:1:1

pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	T-Gb.FbL2-1:1:1

Были также сконструированы две плазмиды, используемые для ко-трансформации и нормализации данных. Одна из контрольных плазмид для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу светляка (*Photinus pyralis*) (FLuc, SEQ ID NO: 207) и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 209). Другая контрольная плазмида для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу фиалки трехцветной (*Renilla reniformis*) (RLuc, SEQ ID NO: 208) и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*.

Растительные экспрессионные векторы pMON80585, pMON109584, pMON118756, pMON124912, pMON140818, pMON140819, pMON140820, pMON140821, pMON140822, pMON140823, pMON140824, pMON140825, pMON140826, pMON140827, pMON140828, pMON140829, pMON140830, pMON140831, pMON140832, pMON140833, pMON140834, pMON140835, pMON140836, pMON140837, pMON140838 и pMON140839 были

использованы для трансформации клеток протопластов семядоли сои с применением методов ПЭГ-трансформации. Клетки протопластов трансформировали эквимолярными количествами каждой из двух контрольных плазмид для трансформации и экспрессионным растительным тест-вектором. Затем анализировали GUS-активность и люциферазную активность. Оценку активности GUS и люциферазы осуществляли путем введения аликвот препаратов лизированных клеток, трансформированных, как описано выше, в два различных планшета с небольшими лунками. Один планшет использовали для оценки GUS, а второй планшет использовали для проведения двойного люциферазного анализа с использованием системы для двойного анализа с люциферазным репортером (Promega Corp., Madison, WI; см., например, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). Оценку образца проводили с 3 или 4 повторами на трансформацию. Средние величины для GUS и люциферазы представлены ниже в таблице 8.

Таблица 8

Средние величины уровней экспрессии GUS и люциферазы и отношения GUS/люциферазы

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Средняя величина GUS	Средняя величина FLuc	Средняя величина RLuc	GUS/ FLuc	GUS/ RLuc
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	586	5220,7	8323	0,1100	0,0700
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	5768	4275	15098	1,3500	0,3800
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	773	7722	10545	0,1000	0,0700
pMON124912	Без промотора		48	9746,5	13905	0,0000	0,0000
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	194	4772	6363	0,0400	0,0300
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	171	6855	10123	0,0200	0,0200
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	37	7089,3	9593	0,0100	0,0000
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	4211	7626,8	13935	0,5500	0,3000
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	626	15609,3	21140	0,0400	0,0300
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	331	15178,5	22818	0,0200	0,0100
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	238	17514,5	28429	0,0100	0,0100
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	510	13208	19567	0,0400	0,0300
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	352	14805,3	22200	0,0200	0,0200
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	724	9326,8	14476	0,0800	0,0500
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	304	11798	17486	0,0300	0,0200

pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	88	5429	9596	0,0200	0,0100
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	180	10477,8	15291	0,0200	0,0100
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	111	5059,3	6778	0,0200	0,0200
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	121	3765	6032	0,0300	0,0200
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	155	10458,8	14748	0,0100	0,0100
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	582	7760	11440	0,0800	0,0500
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	400	11393,8	18654	0,0400	0,0200
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	568	9466,3	13962	0,0600	0,0400
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	87	6683	8494	0,0100	0,0100
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	171	19104,8	29619	0,0100	0,0100
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	90	11247,3	15919	0,0100	0,0057

Для сравнения относительной активности каждого промотора в протопластах семядоли сои, величины GUS выражали как отношение GUS-активности к люциферазной активности, и нормализовали по уровням экспрессии, наблюдаемым для группы конститутивных экспрессионных элементов, EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже в таблице 9 представлены отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже в таблице 10 представлены отношения GUS:люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3.

Таблица 9

Отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	1,12	0,08
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	13,48	1,00
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,00	0,07
pMON124912	Без промотора		0,05	0,00
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	0,41	0,03

pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	0,25	0,02
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	0,05	0,00
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	5,52	0,41
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	0,40	0,03
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	0,22	0,02
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	0,14	0,01
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	0,39	0,03
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	0,24	0,02
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	0,78	0,06
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	0,26	0,02
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	0,16	0,01
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	0,17	0,01
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	0,22	0,02
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	0,32	0,02
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	0,15	0,01
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	0,75	0,06
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	0,35	0,03
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	0,60	0,04
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	0,13	0,01
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	0,09	0,01
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	0,08	0,01

Таблица 10

Отношения GUS: люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/RLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/RLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	0,96	0,18

pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	5,21	1,00
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,00	0,19
pMON124912	Без промотора		0,05	0,01
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	0,42	0,08
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	0,23	0,04
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	0,05	0,01
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	4,12	0,79
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	0,40	0,08
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	0,20	0.04
pMON140824	P-CUCme,8-1:1:2	19	0,11	0.02
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	0,36	0,07
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	0,22	0,04
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	0,68	0,13
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	0,24	0,05
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	0,13	0,02
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	0,16	0,03
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	0,22	0,04
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	0,27	0,05
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	0,14	0,03
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	0,69	0,13
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	0,29	0,06
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	0,55	0,11
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	0,14	0,03
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	0,08	0,02
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	0,08	0,01

Как показано выше в таблицах 9 и 10, большинство тестируемых групп экспрессионных элементов продемонстрировали способность инициировать экспрессию трансгена в клетках протопластов семядоли сои. Одна группа экспрессионных элементов EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), продемонстрировала уровни экспрессии трансгена, превышающие уровни трансгена EXP-

At.Act7:1:11 в этом анализе.

Пример 5: Анализ регуляторных элементов, инициирующих GUS в листьях и корнях сои, бомбардированных частицами

Листья и корни сои были трансформированы растительными экспрессионными векторами, содержащими тестируемую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и их экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в корнях и листьях, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами.

Экспрессию трансгена, запускаемую P-CUCme.1-1:1:1rc (SEQ ID NO:155), P-CUCme.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 14), P-CUCme.3-1:1:3 (SEQ ID NO: 15), EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), EXP-CUCme.5:1:1 (SEQ ID NO: 159), P-CUCme.6-1:1:1 (SEQ ID NO: 18), P-CUCme.8-1:1:2 (SEQ ID NO: 19), P-CUCme.9-1:1:2 (SEQ ID NO: 20), P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme.16a-1:1:2 (SEQ ID NO: 24), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), P-CUCme.21-1:1:1 (SEQ ID NO: 30), P-CUCme.22-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), P-CUCme.26-1:1:2 (SEQ ID NO: 33), P-CUCme.28-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) и EXP-CUCme.29:1:2 (SEQ ID NO: 212), сравнивали с экспрессией, запускаемой известными группами конститутивных экспрессионных элементов в листьях и корнях сои, бомбардированных частицами. Растительные экспрессионные векторы, используемые для трансформации листьев и корней, были аналогичны векторами, указанным в таблице 7 вышеописанного примера 4.

Растительные экспрессионные векторы, pMON80585, pMON109584, pMONl18756, pMON124912, pMON140818, pMON140819, pMON140820, pMON140821, pMON140822, pMON140823, pMON140824, pMON140825, pMON140826, pMON140827, pMON140828, pMON140829, pMON140830, pMON140831, pMON140832, pMON140833, pMON140834, pMON140835, pMON140836, pMON140837, pMON140838 и pMON140839 использовали для трансформации листьев и корней сои методами

трансформации посредством бомбардировки частицами.

Вкратце, поверхность семян сои A3244 стерилизовали и проращивали в планшетах с фотопериодом 16 часов - день и 8 часов - ночь. Приблизительно через 13 дней, из рассады собирали ткани листьев и корней в стерильных условиях, и эти ткани использовали для бомбардировки частицами. Образцы ткани произвольно распределяли по чашкам Петри, содержащим среду для культивирования растений. Десять микрограммов плазмидной ДНК использовали для покрытия золотыми частицами 0,6 микрон (Catalog #165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) в целях бомбардировки. Макроносители нагружали ДНК-покрытыми золотыми частицами (Catalog #165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Для трансформации использовали биобаллистическое «ружье» PDS 1000/He (Catalog #165-2257 Bio-Rad, Hercules CA). Бомбардированные ткани корней и листьев оставляли на 24 часа в темноте при 26°C для инкубирования. После инкубирования в течение ночи, ткани окрашивали в растворе для экспрессии GUS в течение ночи при 37°C. После окрашивания в течение ночи, ткани погружали на ночь в 70% этанол для удаления хлорофилла и для проведения анализа на GUS-окрашивание. Затем ткани фотографировали, и каждой конструкции присваивали оценки «0», «+» - «++++++», в зависимости от уровня экспрессии GUS (0 - отсутствие экспрессии, «+» - «++++++» - от низкого до высокого уровня экспрессии, соответственно).

Под экспрессией трансгена GUS, обнаруженной в каждой ткани, подразумевается относительный потенциальный уровень и специфичность каждого элемента в отношении его способности инициировать экспрессию трансгена в стабильно трансформированных растениях кукурузы. Средние оценки уровней экспрессии GUS представлены ниже в таблице 11.

Таблица 11

Оценки экспрессии GUS в листьях и корнях, бомбардированных частицами

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Экспрессия в листьях	Экспрессия в корнях
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	+++	+++

pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	+++++	++
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	++++	+++
pMON124912	Без промотора		0	0
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	+++	+
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	++	+
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	0	0
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	++++++	+++
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	++	+
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	++	+
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	+	+
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	++	+
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	+++	+++
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	++++	+++
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	+	+
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	+	-
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	++++	+
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	+++	+
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	+	+
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	+	+
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	+	+
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	++++	+
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	+++++	+++
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	+	+
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	+	+
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	+	+

Как показано выше в таблице 11, все группы экспрессионных элементов, кроме одного, обладали способностью инициировать экспрессию трансгена в тканях листьев и корней сои, бомбардированных частицами. В этом анализе, две группы экспрессионных элементов P-CUCme.28-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) и EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156) обнаруживали уровни экспрессии, которые были аналогичны уровням экспрессии или превышали уровни экспрессии, запускаемой EXP-CaMV.35S-

enh+Ph.DnaK:1:3.

Пример 6: Анализ регуляторных элементов, запускающих GUS в протопластах семядоли сои, с использованием ампликонов трансгенных кластеров.

Протопласты семядоли сои трансформировали ампликонами трансгенных кластеров, содержащими группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и его экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в протопластах листьев, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами. Ампликоны трансгенных кластеров состояли из последовательности EXP, функционально присоединенной к GUS-кодирующей последовательности (GUS, SEQ ID NO: 206), функционально присоединенной к 3'-UTR (T-Gb.FbL2-1:1:1, SEQ ID NO: 205). Средний уровень экспрессии GUS сравнивали с уровнем экспрессии контрольных элементов EXP, P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 210) и EXP-At.Atntt1:1:2 (SEQ ID NO: 200).

Плазмиду, используемую для ко-трансформации и нормализации данных, также использовали в методе, аналогичном методу, описанному выше в примере 2. Контрольная плазмида для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу светляка (*Photinus pyralis*) (FLuc, SEQ ID NO: 205), и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 209).

Ниже в таблице 12 представлены средние величины экспрессии GUS, полученные для каждого трансгенного ампликона. Ниже в таблице 13 представлены отношения «GUS:люцифераза светляка (FLuc)», нормализованные по EXP-At.Atntt1:1:2 и P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2.

Таблица 12

Средние величины уровней экспрессии GUS и люциферазы и отношения GUS/люцифераза

Ампликон	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Средняя величина GUS	Средняя величина FLuc	GUS/Fluc
Без ДНК			0,00	0,00	0,00
pMON124912	Без промотора		54,67	34905,00	0,00
pMON33449	P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2	210	107064,67	21757,67	4,92
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	4962,33	40778,67	0,12
56969	CumMe_WSM_SF16429.G5670	40	283,67	53452,00	0,01
56877	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1	175	5297,67	46576,67	0,11
56749	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16563.G5560-1:1:1	176	280,67	41958,33	0,01
56918	CumMe_WSM_SF17051.G5470	48	1088,00	36321,00	0,03
56849	P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1	177	196,00	48128,00	0,00
56754	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	175,67	45427,00	0,00
56892	CumMe_WSM_SF17349.G5770	56	34,00	38016,00	0,00
56477	CumMe_WSM_SF17866.G6050	62	862,00	52203,33	0,02
56842	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1	181	2892,67	49144,33	0,06
56852	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18536.G6480-1:1:1	182	3462,67	46549,33	0,07
56497	CumMe_WSM_SF18575.G6410	71	92,67	47628,33	0,00
56847	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1	183	122,33	36815,33	0,00
56746	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	14,33	62483,33	0,00

56883	CumMe_WSM_SF18986.G6110	79	863,33	54379,33	0,02
56734	EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1	185	142,00	46962,67	0,00
56912	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1	188	7659,00	46935,67	0,16
56482	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	3279,00	37070,67	0,09
56963	CumMe_WSM_SF19902.G5260	87	1629,00	55649,00	0,03
56747	P-CUCme.CumMe_WSM_SF20132.G5560-1:1:1	190	340,33	40577,00	0,01
56479	CumMe_WSM_SF20359.G5870	92	192,00	61341,67	0,00
56744	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98	154,67	33139,33	0,00
56948	CumMe_WSM_SF206534.G5200	99	62,00	52118,00	0,00
56896	CumMe_WSM_SF22008.G5670	108	1585,00	53540,00	0,03
56919	CumMe_WSM_SF22275.G5780	112	8,33	48546,33	0,00
56967	CumMe_WSM_SF22355.G5310	113	74,33	36202,67	0,00
56837	P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1	192	1526,67	52799,33	0,03
56940	CumMe_WSM_SF22870.G5370	115	14,67	53663,33	0,00
56495	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193	196,33	49870,67	0,00
56868	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23906.G6180-1:1:1	194	1584,33	42532,33	0,04
56998	CumMe_WSM_SF24045.G5400	123	80,67	47553,00	0,00
56976	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25141.G5160-1:1:2	195	4506,00	57213,00	0,08
56742	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196	4,00	41114,33	0,00
56915	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1	197	965,33	34494,67	0,03
56854	CumMe_WSM_SF28729.G5340	134	208,33	53956,00	0,00

56936	CumMe_WSM_SF31264.G5380	136	292,67	42320,67	0,01
56863	P-CUCme.CumMe_WSM_SF35856.G5150-1:1:1	198	125,00	48705,33	0,00
56751	P-CUCme.CumMe_WSM_SF41124.G5080-1:1:1	199	31,33	53595,00	0,00
56921	CumMe_WSM_SF41254.G5160	141	11,67	52643,67	0,00
56884	CumMe_WSM_SF42141.G5110	146	48,33	40556,67	0,00

Таблица 13

Отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Atnttl:1:2 и P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2

Ампликон, ID	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по EXP-At.Atnttl:1:2	Отношение GUS/ FLuc, нормализованное по P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2.
Без ДНК			0,00	0,00
pMON124912	Без промотора		0,01	0,00
pMON33449	P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2	210	40,44	1,00
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	1,00	0,02
56969	CumMe_WSM_SF16429.G5670	40	0,04	0,00
56877	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1	175	0,93	0,02
56749	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16563.G5560-1:1:1	176	0,05	0,00
56918	CumMe_WSM_SF17051.G5470	48	0,25	0,01
56849	P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1	177	0,03	0,00

56754	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	0,03	0,00
56892	CumMe_WSM_SF17349.G5770	56	0,01	0,00
56477	CumMe_WSM_SF17866.G6050	62	0,14	0,00
56842	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1	181	0,48	0,01
56852	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18536.G6480-1:1:1	182	0,61	0,02
56497	CumMe_WSM_SF18575.G6410	71	0,02	0,00
56847	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1	183	0,03	0,00
56746	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	0,00	0,00
56883	CumMe_WSM_SF18986.G6110	79	0,13	0,00
56734	EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1	185	0,02	0,00
56912	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1	188	1,34	0,03
56482	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	0,73	0,02
56963	CumMe_WSM_SF19902.G5260	87	0,24	0,01
56747	P-CUCme.CumMe_WSM_SF20132.G5560-1:1:1	190	0,07	0,00
56479	CumMe_WSM_SF20359.G5870	92	0,03	0,00
56744	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98	0,04	0,00
56948	CumMe_WSM_SF206534.G5200	99	0,01	0,00
56896	CumMe_WSM_SF22008.G5670	108	0,24	0,01
56919	CumMe_WSM_SF22275.G5780	112	0,00	0,00
56967	CumMe_WSM_SF22355.G5310	113	0,02	0,00
56837	P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1	192	0,24	0,01

56940	CumMe_WSM_SF22870.G5370	115	0,00	0,00
56495	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193	0,03	0,00
56868	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23906.G6180-1:1:1	194	0,31	0,01
56998	CumMe_WSM_SF24045.G5400	123	0,01	0,00
56976	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25141.G5160-1:1:2	195	0,65	0,02
56742	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196	0,00	0,00
56915	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1	197	0,23	0,01
56854	CumMe_WSM_SF28729.G5340	134	0,03	0,00
56936	CumMe_WSM_SF31264.G5380	136	0,06	0,00
56863	P-CUCme.CumMe_WSM_SF35856.G5150-1:1:1	198	0,02	0,00
56751	P-CUCme.CumMe_WSM_SF41124.G5080-1:1:1	199	0,00	0,00
56921	CumMe_WSM_SF41254.G5160	141	0,00	0,00
56884	CumMe_WSM_SF42141.G5110	146	0,01	0,00

Как показано выше в таблице 12, не все последовательности EXP обладали способностью инициировать экспрессию трансгена, в отличие от контрольных последовательностей без промотора. Однако, последовательности EXP, CumMe_WSM_SF16429.G5670 (SEQ ID NO: 40), P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1 (SEQ ID NO: 175), P-CUCme.CumMe_WSM_SF16563.G5560-1:1:1 (SEQ ID NO: 176), CumMe_WSM_SF17051.G5470 (SEQ ID NO: 48), P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1 (SEQ ID NO: 177), P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1 (SEQ ID NO: 179), CumMe_WSM_SF17866.G6050 (SEQ ID NO: 62), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1 (SEQ ID NO: 181), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18536.G6480-1:1:1 (SEQ ID NO: 182), CumMe_WSM_SF18575.G6410 (SEQ ID NO: 71), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), CumMe_WSM_SF18986.G6110 (SEQ ID NO: 79), EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1 (SEQ ID NO: 185), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1 (SEQ ID NO: 188), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1 (SEQ ID NO: 189), CumMe_WSM_SF19902.G5260 (SEQ ID NO: 87), P-CUCme.CumMe_WSM_SF20132.G5560-1:1:1 (SEQ ID NO: 190), CumMe_WSM_SF20359.G5870 (SEQ ID NO: 92), CumMe_WSM_SF206458.G5970 (SEQ ID NO: 98), CumMe_WSM_SF206534.G5200 (SEQ ID NO: 99), CumMe_WSM_SF22008.G5670 (SEQ ID NO: 108), CumMe_WSM_SF22355.G5310 (SEQ ID NO: 113), P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1 (SEQ ID NO: 192), EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1 (SEQ ID NO: 193), P-CUCme.CumMe_WSM_SF23906.G6180-1:1:1 (SEQ ID NO: 194), CumMe_WSM_SF24045.G5400 (SEQ ID NO: 123), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25141.G5160-1:1:2 (SEQ ID NO: 195), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1 (SEQ ID NO: 197), CumMe_WSM_SF28729.G5340 (SEQ ID NO: 134), CumMe_WSM_SF31264.G5380 (SEQ ID NO: 136) и P-CUCme.CumMe_WSM_SF35856.G5150-1:1:1 (SEQ ID NO: 198) обладали способностью инициировать экспрессию трансгена в протопластах семядоли сои на уровне, аналогичном уровню, наблюдаемому для

EXP-At.Atntt1:1:2 или выше. Как показано выше в таблице 13, в этом анализе, последовательность EXP P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1 (SEQ ID NO: 188) обладала способностью инициировать экспрессию трансгена на уровне, превышающем уровень, наблюдаемый для EXP-At.Atntt1:1:2.

Пример 7: Анализ регуляторных элементов, запускающих GUS в протопластах листьев хлопчатника

Протопласты листьев хлопчатника трансформировали растительными экспрессионными векторами, содержащими тестируемую группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и его экспрессию сравнивали с экспрессией GUS в протопластах листьев, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами.

Экспрессию трансгена, запускаемую P-CUCme.1-1:1:1rc (SEQ ID NO:155), P-CUCme.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 14), P-CUCme.3-1:1:3 (SEQ ID NO: 15), EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), P-CUCme.6-1:1:1 (SEQ ID NO: 18), P-CUCme.8-1:1:2 (SEQ ID NO: 19), P-CUCme.9-1:1:2 (SEQ ID NO: 20), P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme. 16a-1:1:2 (SEQ ID NO: 24), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), P-CUCme.21-1:1:1 (SEQ ID NO: 30), P-CUCme.22-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), P-CUCme.26-1:1:2 (SEQ ID NO: 33), P-CUCme.28-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) и EXP-CUCme.29:1:2 (SEQ ID NO: 212), сравнивали с экспрессией, запускаемой известными группами конститутивных экспрессионных элементов. Каждый экспрессионный вектор растения состоял из правой граничной области *Agrobacterium tumefaciens*; первого трансгенного кластера, который состоял из тест-промотора или известного конститутивного промотора, функционально присоединенного к 5’-концу последовательности, кодирующей β-глюкуронидазу (GUS, SEQ ID NO: 206), содержащую процессируемый интрон, происходящий от свето-индуцируемого тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession:

X04753) и функционально присоединенный к 5′-концу 3'-области терминации гена E6 *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 204), гена RbcS2-E9 *Pisum sativum* (T-Ps.RbcS2-E9-1:1:6, SEQ ID NO: 203), или гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2-1:1:1, SEQ ID NO: 205); второго селективного трансгенного кластера, используемого для отбора трансформированных клеток растений и сообщающего резистентность к гербициду глифосату (запускаемую промотором актина 7 *Arabidopsis*) или резистентность к антибиотику канамицину и левой граничной области *A. tumefaciens*. Контрольный экспрессионный вектор растения, не содержащий промотора (pMON124912), служит в качестве негативного контроля для экспрессии. Вышеупомянутые тестируемые и конститутивные группы экспрессионных элементов клонировали в растительные экспрессионные векторы, указанные ниже в таблице 14.

Таблица 14

Растительные экспрессионные векторы и соответствующая группа экспрессионных элементов и 3'-UTR

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	3'-UTR
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	T-Gb.E6-3b:1:1
pMON124912	Без промотора		T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	T-Gb.FbL2-1:1:1

pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	T-Gb.FbL2-1:1:1
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	T-Gb.FbL2-1:1:1

Были также сконструированы две плазмиды, используемые для ко-трансформации и нормализации данных. Одна из контрольных плазмид для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу светляка (*Photinus pyralis*) (FLuc, SEQ ID NO: 205) и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 209). Другая контрольная плазмида для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу фиалки трехцветной (*Renilla reniformis*) (RLuc, SEQ ID NO: 206), и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*.

Растительные экспрессионные векторы pMON80585, pMON109584, pMON118756, pMON124912, pMON140818, pMON140819, pMON140820, pMON140821, pMON140822, pMON140823, pMON140824, pMON140825, pMON140826, pMON140827, pMON140828, pMON140829, pMON140830, pMON140831, pMON140832, pMON140833, pMON140834, pMON140835, pMON140836, pMON140837, pMON140838 и pMON140839 были использованы для трансформации клеток протопластов листьев хлопчатника сои с применением методов ПЭГ-трансформации. Клетки протопластов трансформировали эквимолярными количествами каждой из двух контрольных плазмид для трансформации и экспрессионным растительным тест-вектором. Затем анализировали GUS-активность

и люциферазную активность. Оценку активности GUS и люциферазы осуществляли путем введения аликвот препаратов лизированных клеток, трансформированных, как описано выше, в два различных планшета с небольшими лунками. Один планшет использовали для оценки GUS, а второй планшет использовали для проведения двойного люциферазного анализа с использованием системы для двойного анализа с люциферазным репортером (Promega Corp., Madison, WI; см., например, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). Оценку образца проводили с 4 повторами на трансформацию. Средние величины для GUS и люциферазы представлены ниже в таблице 15.

Таблица 15

Средние величины уровней экспрессии GUS и люциферазы и отношения GUS/люцифераза

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Средняя величина GUS	Средняя величина FLuc	Средняя величина RLuc	GUS/ FLuc	GUS /RLuc
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	5322,8	14842,8	27990,5	0,3586	0,1902
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1006,3	19746,8	25582,3	0,0510	0,0393
pMON124912	Без промотора		21	19248,5	25012	0,0011	0,0008
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	170,3	17796,8	22026,3	0,0096	0,0077
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	34,8	16326,3	21407,5	0,0021	0,0016
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	51,5	17356,8	21523,8	0,0030	0,0024
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	3497,8	18745,3	26065,3	0,1866	0,1342
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	40,8	19533,8	26361,5	0,0021	0,0015
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	22	19701	26278	0,0011	0,0008
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	372,5	21972,3	28755	0,0170	0,0130
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	198	21362,8	28902	0,0093	0,0069
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	725	21589	27635,3	0,0336	0,0262
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	55,3	17706	28846	0,0031	0,0019
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	14	23289,5	30190	0,0006	0,0005
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	155,5	23178,3	31602,8	0,0067	0,0049
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	86,8	19085,8	22396,5	0,0045	0,0039
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	130	21520,3	27270,5	0,0060	0,0048
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	88,5	22223,8	30786	0,0040	0,0029
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	98,5	18579	20506,3	0,0053	0,0048
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	363	21780,3	28816,3	0,0167	0,0126

pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	515	17906	23031	0,0288	0,0224
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	125	15529,3	15169,3	0,0080	0,0082
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	115,8	17013,5	22236,5	0,0068	0,0052
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	15,5	16370,3	20409	0,0009	0,0008

Для сравнения относительной активности каждого промотора в протопластах листьев хлопчатника, величины GUS выражали как отношение GUS-активности к люциферазной активности, и нормализовали по уровням экспрессии, наблюдаемым для группы конститутивных экспрессионных элементов, EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже в таблице 16 представлены отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ниже, в таблице 17 представлены отношения GUS:люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3.

Таблица 16

Отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/FLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/FLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	7,037	1,000
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,000	0,142
pMON124912	Без промотора		0,021	0,003
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	0,188	0,027
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	0,042	0,006
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	0,058	0,008
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	3,662	0,520
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	0,041	0,006
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	0,022	0,003

pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	0,333	0,047
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	0,182	0,026
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	0,659	0,094
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	0,061	0,009
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	0,012	0,002
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	0,132	0,019
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	0,089	0,013
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	0,119	0,017
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	0,078	0,011
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	0,104	0,015
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	0,327	0,046
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	0,564	0,080
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	0,158	0,022
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	0,134	0,019
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	0,019	0,003

Таблица 17

Отношения GUS: люцифераза *renilla* (RLuc), нормализованные по EXP-At.Act7:1:11 и EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/RLuc, нормализованное по EXP-At.Act7:1:11	Отношение GUS/RLuc, нормализованное по EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3
pMON109584	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	201	4,83	1,00
pMON118756	EXP-At.Act7:1:11	202	1,00	0,21
pMON124912	Без промотора		0,02	0,00
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	0,20	0,04
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14	0,04	0,01
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15	0,06	0,01

pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	3,41	0,71
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	0,04	0,01
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19	0,02	0,00
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	0,33	0,07
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21	0,17	0,04
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	0,67	0,14
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	0,05	0,01
pMON140829	P-CUCme.16a-1:1:2	24	0,01	0,00
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	0,13	0,03
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	0,10	0,02
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	0,12	0,03
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	0,07	0,02
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30	0,12	0,03
pMON140835	P-CUCme.22-1:1:3	31	0,32	0,07
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	0,57	0,12
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	0,21	0,04
pMON140838	P-CUCme.28-1:1:2	34	0,13	0,03
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	0,02	0,00

Как показано выше в таблицах 16 и 17, большинство тестируемых групп экспрессионных элементов продемонстрировали способность инициировать экспрессию трансгена в клетках протопластов листьев хлопчатника. Одна группа экспрессионных элементов EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156) продемонстрировала уровни экспрессии трансгена, превышающие уровни экспрессии трансгена EXP-At.Act7:1:11 в этом анализе.

Пример 8: Анализ регуляторных элементов, запускающих GUS в протопластах листьев хлопчатника, с использованием ампликонов трансгенных кластеров.

Протопласты листьев хлопчатника трансформировали ампликонами трансгенных кластеров, содержащими группу экспрессионных элементов регуляции транскрипции, запускающих экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS), и его экспрессию

сравнивали с экспрессией GUS в протопластах листьев, в которых экспрессия GUS запускается известными конститутивными промоторами. Ампликоны трансгенных кластеров состояли из последовательности EXP, функционально присоединенной к GUS-кодирующей последовательности (GUS, SEQ ID NO: 206), функционально присоединенной к 3'-UTR (T-Gb.FbL2-1:1:1, SEQ ID NO: 205). Средний уровень экспрессии GUS сравнивали с уровнем экспрессии контрольных элементов EXP, P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 210) и EXP-At.Atntt1:1:2 (SEQ ID NO: 200).

Плазмиду, используемую для ко-трансформации и нормализации данных, также использовали в методе, аналогичном методу описанному выше в примере 2. Контрольная плазмида для трансформации состояла из конститутивного промотора, запускающего экспрессию последовательности, кодирующей люциферазу светляка (*Photinus pyralis*) (FLuc, SEQ ID NO: 205), и функционально присоединенной к 5′-концу 3'-области терминации, происходящей от гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 209).

Ниже в таблице 18 представлены средние величины экспрессии GUS, полученные для каждого трансгенного ампликона. Ниже в таблице 19 представлены отношения «GUS:люцифераза светляка (FLuc)», нормализованные по EXP-At.Atntt1:1:2 и P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2.

Таблица 18

Средние величины уровней экспрессии GUS и люциферазы и отношения GUS/люцифераза

Ампликон, ID	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Средняя величина GUS	Средняя величина FLuc	GUS/ FLuc
Пустой вектор	Без ДНК		32,8	14087,5	0,002
pMON124912	Без промотора		12	20486,3	0,001
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	55,5	18811	0,003

pMON33449	P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2	210	12472,5	19126,3	0,652
56741	CumMe_WSM_SF143981.G5150	36	5,8	17449,5	0,000
56492	CumMe_WSM_SF144839.G5080	37	27,5	16674	0,002
56877	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1	175	96,3	17237,8	0,006
56485	CumMe_WSM_SF16530.G6000	42	27,3	17858,5	0,002
56844	CumMe_WSM_SF16953.G5180	47	22,3	19398,5	0,001
56500	CumMe_WSM_SF17250.G5910	52	12,3	23980,3	0,001
56754	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	16	13848,8	0,001
56740	CumMe_WSM_SF17672.G5610	60	12	16646,8	0,001
56870	CumMe_WSM_SF18287.G5380	66	39,3	13930,5	0,003
56478	CumMe_WSM_SF18504.G5090	68	11,8	15830,5	0,001
56481	CumMe_WSM_SF18530.G5750	69	6,5	15211,3	0,000
56498	CumMe_WSM_SF18645.G5380	73	36	14569,8	0,002
56746	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	11	18054,5	0,001
56490	CumMe_WSM_SF18801.G5040	75	21,5	14147,3	0,002
56488	CumMe_WSM_SF19323.G5120	81	15,3	11985,3	0,001
56499	CumMe_WSM_SF19631.G5170	83	12,5	20140,5	0,001
56482	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	75	18690,5	0,004
56489	CumMe_WSM_SF19850.G5130	86	38,3	19756,5	0,002
56476	CumMe_WSM_SF20355.G5130	91	10,5	27901,8	0,000
56895	CumMe_WSM_SF20431.G6340	95	34,8	16283,8	0,002
56744	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98	11	19659	0,001
56480	CumMe_WSM_SF21366.G5980	105	10,8	17367	0,001
56930	CumMe_WSM_SF22070.G5280	109	25,3	14210,5	0,002
56484	CumMe_WSM_SF23181.G5100	117	20,3	13506	0,002
56495	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193	7,8	15138,5	0,001
56971	CumMe_WSM_SF25084.G5580	125	16	16135,3	0,001

56742	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196	18	13782,8	0,001
56494	CumMe_WSM_SF25455.G5370	129	10,5	16089,8	0,001
56751	P-CUCme.CumMe_WSM_SF41124.G5080-1:1:1	199	24,3	17884,3	0,001
56483	CumMe_WSM_SF41644.G6400	143	14,5	13130,5	0,001
56904	CumMe_WSM_SF44933.G5290	147	33	13369	0,002
56743	CumMe_WSM_SF9060.G5120	154	11,3	15230,8	0,001

Таблица 19

Отношения GUS: люцифераза светляка (FLuc), нормализованные по EXP-At.Atnttl:1:2 и P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2

Ампликон, ID	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Отношение GUS/FLuc, нормализованное по EXP-At.Atnttl:1:2	Отношение GUS/FLuc, нормализованное по P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2.
Пустой вектор	Без ДНК			
pMON124912	Без промотора			
pMON80585	EXP-At.Atntt1:1:2	200	1,000	0,005
pMON33449	P-CaMV.35S-enh-1:1:102/L-CaMV.35S-1:1:2	210	221,025	1,000
56741	CumMe_WSM_SF143981.G5150	36	0,113	0,001
56492	CumMe_WSM_SF144839.G5080	37	0,559	0,003
56877	P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1	175	1,893	0,009
56485	CumMe_WSM_SF16530.G6000	42	0,518	0,002
56844	CumMe_WSM_SF16953.G5180	47	0,390	0,002
56500	CumMe_WSM_SF17250.G5910	52	0,174	0,001
56754	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	0,392	0,002
56740	CumMe_WSM_SF17672.G5610	60	0,244	0,001
56870	CumMe_WSM_SF18287.G5380	66	0,956	0,004
56478	CumMe_WSM_SF18504.G5090	68	0,253	0,001
56481	CumMe_WSM_SF18530.G5750	69	0,145	0,001

56498	CumMe_WSM_SF18645.G5380	73	0,837	0,004
56746	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	0,207	0,001
56490	CumMe_WSM_SF18801.G5040	75	0,515	0,002
56488	CumMe_WSM_SF19323.G5120	81	0,433	0,002
56499	CumMe_WSM_SF19631.G5170	83	0,210	0,001
56482	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	1,360	0,006
56489	CumMe_WSM_SF19850.G5130	86	0,657	0,003
56476	CumMe_WSM_SF20355.G5130	91	0,128	0,001
56895	CumMe_WSM_SF20431.G6340	95	0,724	0,003
56744	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98	0,190	0,001
56480	CumMe_WSM_SF21366.G5980	105	0,211	0,001
56930	CumMe_WSM_SF22070.G5280	109	0,603	0,003
56484	CumMe_WSM_SF23181.G5100	117	0,509	0,002
56495	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193	0,175	0,001
56971	CumMe_WSM_SF25084.G5580	125	0,336	0,002
56742	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196	0,443	0,002
56494	CumMe_WSM_SF25455.G5370	129	0,221	0,001
56751	P-CUCme.CumMe_WSM_SF41124.G5080-1:1:1	199	0,461	0,002
56483	CumMe_WSM_SF41644.G6400	143	0,374	0,002
56904	CumMe_WSM_SF44933.G5290	147	0,837	0,004
56743	CumMe_WSM_SF9060.G5120	154	0,251	0,001

Как показано выше в таблице 18, не все последовательности EXP обладали способностью инициировать экспрессию трансгена, в отличие от контрольных последовательностей без промотора. Однако, последовательности EXP, P-CUCme.CumMe_WSM_SF16444.G5140-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) и P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1 (SEQ ID NO: 189) обладали способностью инициировать экспрессию трансгена в протопластах семядоли сои на уровне, аналогичном уровню, наблюдаемому для

EXP-At.Atntt1:1:2, или выше. Как показано выше в таблице 19, в этом анализе, последовательность EXP P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1 (SEQ ID NO: 189) обладала способностью инициировать экспрессию трансгена на уровне, превышающем уровень, наблюдаемый для EXP-At.Atntt1:1:2.

Пример 9: Анализ регуляторных элементов, инициирующих GUS в стабильно трансформированной сое.

Растения сои трансформировали растительными экспрессионными векторами, содержащими последовательность EXP, запускающую экспрессию трансгена β-глюкуронидазы (GUS).

Экспрессию трансгена GUS, запускаемую EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubql:1:3 (SEQ ID NO: 7), P-CUCme.1-1:1:lrc (SEQ ID NO: 155), P-CUCme.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 14), P-CUCme.3-1:1:3 (SEQ ID NO: 15), EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), EXP-CUCme.5:1:1 (SEQ ID NO: 159), P-CUCme.6-1:1:1 (SEQ ID NO: 18), P-CUCme.8-1:1:2 (SEQ ID NO: 19), P-CUCme.9-1:1:2 (SEQ ID NO: 20), P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), P-CUCme.21-1:1:1 (SEQ ID NO: 30), EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), P-CUCme.26-1:1:2 (SEQ ID NO: 33), EXP-CUCme.29:1:2 (SEQ ID NO: 212), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1 (SEQ ID NO: 196), P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1 (SEQ ID NO: 177), P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1 (SEQ ID NO: 192), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1 (SEQ ID NO: 181), P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1 (SEQ ID NO: 185), P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1 (SEQ ID NO: 179), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1 (SEQ ID NO: 188), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1 (SEQ ID NO: 197), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1 (SEQ ID NO: 189), CumMe_WSM_SF206458.G5970 (SEQ ID NO: 98) и P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1 (SEQ ID NO: 184),

качественно оценивали путем анализа окрашенных срезов ткани, а затем проводили количественную оценку. Каждый экспрессионный вектор растения состоял из правой граничной области *Agrobacterium tumefaciens*; первого трансгенного кластера, который состоял из последовательности EXP, функционально присоединенной к 5'-концу последовательности, кодирующей β-глюкуронидазу (GUS, SEQ ID NO: 206), содержащую процессируемый интрон, происходящий от свето-индуцируемого тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753) и функционально присоединенный к 5'-концу 3'-области терминации гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2-1:1:1, SEQ ID NO: 205); второго селективного трансгенного кластера, используемого для отбора трансформированных клеток растений и сообщающего резистентность к гербициду глифосату (запускаемую промотором актина 7 *Arabidopsis*), и левой граничной области *A. tumefaciens*.

Вышеуказанные последовательности EXP клонировали в растительные экспрессионные конструкции, представленные ниже в таблицах 20-23, и использовали для трансформации растений сои методом трансформации, опосредуемой агробактерией. Экспрессию GUS качественно оценивали путем анализа гистологических срезов отобранных тканей, а затем проводили количественную оценку.

Гистохимический анализ GUS проводили для качественной оценки экспрессии в трансгенных растениях. Срезы целой ткани инкубировали с раствором для окрашивания GUS X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил-b-глюкуронидом) (1 миллиграмм/миллилитр) в течение определенного периода времени, а затем промывали и визуально оценивали на появление синей окраски. Качественный анализ GUS-активности проводили путем непосредственной визуальной оценки отобранных органов и тканей растения или оценки под микроскопом. Растения R_0-генерации оценивали на экспрессию в корнях Vn5; корнях R1, во влагалище листа Vn5, в первом листе Vn5, в первом листе R1, в черешках R1, в эмбрионах желтых стручков, в семядоле желтых стручков, в незрелых семенах R3, в стручках R3, в семядоле R5 и в цветках R1.

Для количественного анализа, весь белок был экстрагирован

из отобранных тканей трансгенных растений кукурузы. Один микрограмм общего белка использовали вместе с флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронида (MUG) в общем реакционном объеме 50 микролитров. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4-MU), обнаруживал максимальную флуоресценцию при высоких значениях pH, где гидроксильная группа является ионизованной. После добавления основного раствора карбоната натрия, анализ прекращали, и pH корректировали для количественной оценки флуоресцентного продукта. Флуоресценцию измеряли на длине волны возбуждения 365 нм и на длине волны излучения 445 нм на оборудовании Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Japan) с ридером Micromax, с шириной щели, установленной при возбуждении на 2 нм и излучении на 3 нм.

Ниже в таблицах 20 и 21 указаны средние количественные уровни экспрессии, измеренные в тканях растений R_0-генерации. В обеих таблицах, непроанализированные ткани представлены как контрольные клетки.

Таблица 20

Средние уровни экспрессии GUS в корнях Vn5; корнях R1, во влагалище листа Vn5, в первом листе Vn5, в первом листе R1 и в черешках R1 трансформированных растений сои R_0-генерации

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Корни Vn5	Корни R1	Влагалище листа Vn5	Первый лист Vn5	Первый лист R1	Черешок R1
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	4				4	4
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	16		1	2	13	23
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	48,21		22,35	20,24	33,01	78,17
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14						
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15						
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	96,82		28,32	39,17	322,98	280,03
pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	28,88				41,11	
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	23,94				32,14	30,22
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19						
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	22,06				21,22	23,08
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21						
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	189,24	153,52	59,6	37,44	103,01	130,6
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23	30,53					
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	51,62		30,07	31,08	30,49	60,14
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	57,38					30,03

pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	23,07		50,21	59,73	65,58	137,42
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	23,15		61,6	118,76	502,55	119,46
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30					25,49	
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	230,89	184,88	65,44	53,36	118,82	351,49
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	56,21		26,81	45,07	51,61	47,42
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	82,17		45,2	28,27	64,96	109,9
pMON144926	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196	28,53					
pMON144927	P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1	177	23,62					
pMON144928	P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1	192	75,62		23	20,46	21,78	39,77
pMON144931	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1	181	43,2					52,55
pMON144933	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193	25,61		20,45	0	0	28,69
pMON146941	EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1	185	33,5		0	0	24,27	47,82
pMON144932	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179	32,54		23,76	21,5	0	22,21
pMON146940	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1	183	0		0	0	0	0

pMON147340	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1	188	28,9		0	0	29,77	25,82
pMON147342	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1	197	50,15		24,26	0	29,38	29,91
pMON147343	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189	36,05		25,7	27,54	22,85	37,15
pMON144929	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98						
pMON147304	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184	35,01		21,17	21,23	22	44,57

Таблица 21

Средние уровни экспрессии GUS в эмбрионах желтых стручков, в семядоле желтых стручков, в незрелых семенах R3, в стручках R3, в семядоле R5 и в цветках R1 трансформированных растений сои R_0-генерации

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Эмбрионы желтых стручков	Семядоли желтых стручков	Незрелые семена R3	Стручки R3	Семядоля R5	Цветки R1
pMON138776	EXP-CUCme.Ubq1:1:1	1	12	9	13	11	10	7
pMON138778	EXP-CUCme.Ubq1:1:3	7	3	1	13	9	13	27
pMON140818	P-CUCme.1-1:1:1rc	155	100,79	117,5	38,31	84,72	132,27	66,8
pMON140819	P-CUCme.2-1:1:1	14					20,35	36,18
pMON140820	P-CUCme.3-1:1:3	15						
pMON140821	EXP-CUCme.4:1:1	156	86,68	225,53	105,62	342,07	119,08	184,92

pMON140822	EXP-CUCme.5:1:1	159	21,48	32,27	21,47	21,66		36,88
pMON140823	P-CUCme.6-1:1:1	18	38,75		23,03		25,32	58,7
pMON140824	P-CUCme.8-1:1:2	19					90,33	25,77
pMON140825	P-CUCme.9-1:1:2	20	132,04			20,56	34,78	
pMON140826	P-CUCme.10-1:1:1	21					22,34	
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	200,28	291,26	58,21	131,17	114,29	130,38
pMON140828	P-CUCme.15-1:1:2	23			142,24	26,2		
pMON140830	P-CUCme.17-1:1:2	26	343,34	302,94	65,55	80,94	137,02	62,7
pMON140831	P-CUCme.18-1:1:2	27	103,17	135,97	30	34,62	88,14	23,73
pMON140832	P-CUCme.19-1:1:3	167	30,96	64,46		316,66		53,46
pMON140833	P-CUCme.20-1:3	211	174,62	524,88		222,04	59,43	124,68
pMON140834	P-CUCme.21-1:1:1	30			28,15	20,52	23,89	
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	110,23	159,43	61,99	248,96	49,17	224,24
pMON140837	P-CUCme.26-1:1:2	33	56,73	50,06	70	143,05	25,06	49,92
pMON140839	EXP-CUCme.29:1:2	212	251,76	237,2	49,16	89,28	114,92	57,84
pMON144926	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1	196			21,41		22,23	
pMON144927	P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1	177	58,84	28,94			20,97	
pMON144928	P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1	192	135,62	152,48	30,45	51,71	129,72	42,2
pMON144931	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1	181	866,94		23,26	21,49		

pMON144933	P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1	193			29,03	34,9	69,63	24,42
pMON146941	EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1	185			36,69	83,08	89,81	33,99
pMON144932	P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1	179			34,29	39,89	113,83	0
pMON146940	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1	183			30,25	0	0	0
pMON147340	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1	188			25,73	28,28	24,04	23,35
pMON147342	P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1	197			104,02	80,27	31,06	26,8
pMON147343	P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1	189						29,09
pMON144929	CumMe_WSM_SF206458.G5970	98			24,42	25,33		
pMON147304	P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1	184				283,49		61,43

Как показано в таблицах 20 и 21, последовательности EXP, EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1), EXP-CUCme.Ubql:1:3 (SEQ ID NO: 7), P-CUCme.1-1:1:lrc (SEQ ID NO: 155), P-CUCme.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 14), EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), EXP-CUCme.5:1:1 (SEQ ID NO: 159), P-CUCme.6-1:1:1 (SEQ ID NO: 18), P-CUCme.8-1:1:2 (SEQ ID NO: 19), P-CUCme.9-1:1:2 (SEQ ID NO: 20), P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), P-CUCme.21-1:1:1 (SEQ ID NO: 30), EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), P-CUCme.26-1:1:2 (SEQ ID NO: 33), EXP-CUCme.29:1:2 (SEQ ID NO: 212), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25355.G5000-1:1:1 (SEQ ID NO: 196),P-CUCme.CumMe_WSM_SF17111.G5790-1:1:1 (SEQ ID NO: 177), P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1 (SEQ ID NO: 192), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1 (SEQ ID NO: 181), P-CUCme.CumMe_WSM_SF23760.G5200-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), EXP-CUCme.WSM_SF19064.G5690:1:1 (SEQ ID NO: 185), P-CUCme.WSM_SF17252.G7330-1:1:1 (SEQ ID NO: 179), P-CUCme.CumMe_WSM_SF18634.G5190-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19647.G5760-1:1:1 (SEQ ID NO: 188), P-CUCme.CumMe_WSM_SF25936.G5450-1:1:1 (SEQ ID NO: 197), P-CUCme.CumMe_WSM_SF19839.G5090-1:1:1 (SEQ ID NO: 189), CumMe_WSM_SF206458.G5970 (SEQ ID NO: 98) и P-CUCme.CumMe_WSM_SF18716.G5860-1:1:1 (SEQ ID NO: 184) обладали способностью инициировать экспрессию трансгена в некоторых или во всех тканях, как показал количественный анализ, в зависимости от последовательностей EXP, используемых для запуска экспрессии.

Гистологический анализ отобранных срезов тканей со всей очевидностью указывал на экспрессию многих последовательностей EXP. EXP-CUCme.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 1) и EXP-CUCme.Ubq1:1:3 (SEQ ID NO: 7) продемонстрировали конститутивный характер экспрессии с окрашиванием, наблюдаемым во всех тканях, даже несмотря на то, что количественный анализ указывал на довольно низкие уровни экспрессии. По всей вероятности, характер

экспрессии такого типа мог случайно запускать экспрессию трансгенов, которым требуется низкий уровень конститутивной экспрессии. Экспрессия, запускаемая P-CUCme.1-1:1:1rc (SEQ ID NO: 155), наблюдалась в васкулярных утолщениях влагалища листа и первого листа, и в ксилеме, а также в кожице корней, во флоэме, в ксилеме, в эндодермисе, в стеле и на острие листа. Экспрессия, запускаемая EXP-CUCme.4:1:1 (SEQ ID NO: 156), наблюдалась во всех тканях, причем, наивысший уровень экспрессии наблюдался на репродуктивной стадии развития растения. Экспрессия, запускаемая P-CUCme.10-1:1:1 (SEQ ID NO: 21), наблюдалась только во влагалище листа V5 и в пыльнике цветка R1. Экспрессия, запускаемая EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162), имела конститутивный характер, причем, наивысший уровень экспрессии наблюдался в эмбрионах желтых стручков и в семядоле. Активность в эмбрионах желтых стручков в R1-генерации была в 5 раз выше, чем в R0-генерации (см. ниже таблицу 23). Экспрессия, запускаемая P-CUCme.15-1:1:2 (SEQ ID NO: 23), P-CUCme.17-1:1:2 (SEQ ID NO: 26) и P-CUCme.18-1:1:2 (SEQ ID NO: 27), имела конститутивный характер, на что указывал гистологический анализ. Экспрессия, запускаемая P-CUCme.19-1:1:3 (SEQ ID NO: 167), имела конститутивный характер, на что указывал гистологический анализ, за исключением экспрессии, наблюдаемой в корнях V5 и в черешках R1. В стручках R3 наблюдался самый высокий уровень экспрессии.

Экспрессия, запускаемая P-CUCme.20-1:3 (SEQ ID NO: 211), имела конститутивный характер, на что указывал гистологический анализ, за исключением экспрессии, наблюдаемой в корнях V5. Наивысший уровень экспрессии наблюдался в семядоле на стадии R8. Экспрессия, запускаемая EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), имела конститутивный характер и наблюдалась во всех тканях, на что указывал гистологический анализ. В R1-генерации наблюдалось повышение уровней экспрессии GUS (см. ниже таблицы 22 и 23). В цветках и в черешках на стадии R1 растения сои наблюдались наивысшие уровни экспрессии. Экспрессия, запускаемая P-CUCme.CumMe_WSM_SF22531.G5120-1:1:1 (SEQ ID NO: 192), имела конститутивный характер, на что указывал

гистологический анализ, причем, наивысший уровень экспрессии наблюдался в семядоле и в эмбрионах на стадии R8. Экспрессия, запускаемая P-CUCme.CumMe_WSM_SF18488.G5340-1:1:1 (SEQ ID NO: 181), имела конститутивный характер, а количественно высокий уровень экспрессии наблюдался в эмбрионах желтых стручков.

Растения R_0-генерации, трансформированные плазмидными конструкциями, содержащими EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162) и EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), выращивали до стадии созревания семян, и растения в R_1-генерации анализировали на экспрессию GUS. Растения R_1-генерации анализировали на экспрессию в корнях Vn5; во влагалище листа Vn5, в первом листе Vn5, в первом листе R1, в черешках R1, в эмбрионах желтых стручков, в семядоле желтых стручков, в незрелых семенах R3, в стручках R3, в семядоле R5 и в цветках R1. В таблицах 22 и 23 представлены средние уровни экспрессии GUS, измеренные в каждой ткани трансформированных растений R_1-генерации.

Таблица 22

Средние уровни экспрессии GUS в корнях Vn5; во влагалище листа Vn5, в первом листе Vn5, в первом листе R1 и в черешках R1 трансформированных растений сои R_1-генерации

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Корни Vn5	Влагалище листа Vn5	Первый лист Vn5	Первый лист R1	Черешок R1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	145,84	50,24	43,73	107,98	357,67
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	260,41	65,52	51,12	129,86	623,42

Таблица 23

Средние уровни экспрессии GUS в эмбрионах желтых стручков, в семядоле желтых стручков, в незрелых семенах R3, в стручках R3, в семядоле R5 и в цветках R1 трансформированных растений сои R_1-генерации

Конструкция	Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Эмбрионы желтых стручков	Семядоли желтых стручков	Незрелые семена R3	Стручки R3	Семядоли R5	Цветки R1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	162	1098,51	764,83	288,77	214,6	459,62	394,77
pMON140836	EXP-CUCme.SAMS2:1:1	168	219,04	291,58	241,48	382,73	397,91	653,23

Как показано в таблицах 22 и 23, в растениях R_1-генерации, экспрессия, запускаемая EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 162) и EXP-CUCme.SAMS2:1:1 (SEQ ID NO: 168), имела конститутивный характер, причем, во многих тканях растений R_1-генерации, уровень экспрессии превышал уровень экспрессии в растениях R_0-генерации.

Исходя из проиллюстрированных и описанных в настоящем описании принципов настоящего изобретения, для специалиста в данной области будет очевидно, что в структуру описания настоящего изобретения могут быть внесены изменения и конкретные варианты, не выходящие за рамки таких принципов изобретения. При этом, подразумевается, что все модификации, входящие в заявленные сущность и объем формулы изобретения, входят в объем настоящего изобретения. Все цитируемые в настоящем описании публикации и опубликованные патентные документы во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была отдельно и конкретно введена в настоящее изобретение посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула ДНК, проявляющая функциональную активность регуляции генов, содержащая полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

2. Молекула ДНК по п. 1, где указанная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 168.

3. Молекула ДНК по п. 1, где указанная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 95% идентична полинуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 168.

4. Молекула ДНК по п. 1, где гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула содержит ген, представляющий агрономический интерес.

5. Молекула ДНК по п. 4, где указанный ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к гербицидам.

6. Молекула ДНК по п. 4, где указанный ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к вредителям.

7. Клетка трансгенного растения, содержащая гетерологичную молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность

регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

8. Клетка трансгенного растения по п. 7, где указанная клетка трансгенного растения представляет собой клетку однодольного растения.

9. Клетка трансгенного растения по п. 7, где указанная клетка трансгенного растения представляет собой клетку двудольного растения.

10. Трансгенное растение или его часть, содержащая молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

11. Потомство трансгенного растения по п. 10 или часть растения-потомка, где потомство трансгенного растения или часть растения-потомка содержит указанную молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов.

12. Трансгенное семя, содержащее молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

13. Способ получения товарного продукта, включающий:

a) получение трансгенного растения или его части, содержащих молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле; и

b) получение из указанного растения товарного продукта.

14. Способ по п. 13, где товарный продукт представляет собой белковый концентрат, белковый изолят, зерно, крахмал, семена, кормовая мука, мука, биомасса или растительное масло.

15. Товарный продукт, содержащий молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле.

16. Способ обеспечения экспрессии транскрибируемой молекулы, включающий:

a) получения трансгенного растения, содержащего молекулу ДНК, проявляющую функциональную активность регуляции генов и содержащую полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO: 168;

b) последовательности, включающей SEQ ID NO: 168; и

c) фрагмента SEQ ID NO: 168, проявляющего активность

регуляции генов;

где указанная молекула ДНК функционально присоединена к гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекуле; и

b) культивирование указанного трансгенного растения, где экспрессируется транскрибируемый полинуклеотид.

По доверенности

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      ATCTGAAAGGAACACCTAGCAAGGGGCTACTCTACAAGCATACTAAGTCTACAAAGCTAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      AGTTGTATGGTTATGCAGAAGACCTGGACAAAAGAAGATCACTCGCTGCTTTTACTTTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TCCTAAGAGGAAATGTGATTTTATGGAAGTTTAACCTATAGCCTGTAGTGGCACTATTCA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)      -----------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)      -----------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CAACAAAAGTAAAGTTTATAGCCATGACTGAAGTTGTTAAAGAAGTCGTCTGGCTAAAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GACTACTTGAAGAACTTGGCTTCTTTTAACAGTCAGTAAACATCATGTGTGATAGTTAAA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GTGCAATACACTTGTCTAAAAATCTGCAATATCACGAAAGAACTAAGCATATTGATGTGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------
```

ФИГ. 1a

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      AGCTATATGTCATTAGAGAAGTCATAGCAAAGAGAAAAGTAACAGTATCAAAGGTTCAGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CAAAAGAAAATGCAGCAGATATGTTGACTAAAATAGTTACTAATGCTAAACTCGAGCACT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GCCTACAGTTGCTCAAGGTAATAGACTACTTAAAAGAATAGAATCAGAAGAAATAGTCAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TGGTAGCAATAAAATTCAAGGTGGAGGATTGTTAAAAAGAAGAGTGAATTTTATTACTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      AAGAAAATCTCGGTGAAACTCGAAAGATCTCGATTCGAAACTCTATTGCTTAAGAACCTG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ---------TCGGTGAAACTCGAAAGATCTCGATTCGAAACTCTATTGCTTAAGAACCTG
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GTGAAGCTCGAGAGATCTTGATACAATCCCAGTGCCCTAACTCTTCAACAAGCTAAGCAA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      GTGAAGCTCGAGAGATCTTGATACAATCCCAGTGCCCTAACTCTTCAACAAGCTAAGCAA
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------
```


ФИГ. 1b

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GTTGTACTGTGGGGCTCAATCTCGGTTCAATCTCGACGCACCTGATGCTTTGTTCCCTGT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      GTTGTACTGTGGGGCTCAATCTCGGTTCAATCTCGACGCACCTGATGCTTTGTTCCCTGT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CTACTCGATGAAGAAGCAATTACTTCTCAGGACAACTCGGTACCCCTAAATACAGATTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      CTACTCGATGAAGAAGCAATTACTTCTCAGGACAACTCGGTACCCCTAAATACAGATTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GAGCTTCGTGATCCTACAACTGAAATCAAATAGAAAAACTAATAAGTTAGTTAGAGTTTG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      GAGCTTCGTGATCCTACAACTGAAATCAAATAGAAAAACTAATAAGTTAGTTAGAGTTTG
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TTATATTTACTGCCATTAAATAACTCTGTAATGTAAATAATAAACCATTTAACTCAATAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TTATATTTACTGCCATTAAATAACTCTGTAATGTAAATAATAAACCATTTAACTCAATAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GAAATATAGAATGAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGTTAAAGAGAGAGAGGAAGAAAACTCAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      GAAATATAGAATGAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGTTAAAGAGAGAGAGGAAGAAAACTCAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TTTCAAATTCTCTATACTTGTTTGATCCTTGAATAAGTTGAATAAAAGCTCTATGGCGGC
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TTTCAAATTCTCTATACTTGTTTGATCCTTGAATAAGTTGAATAAAAGCTCTATGGCGGC
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------
```


ФИГ. 1c

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TTCAAAGTGGATGTAGGCACTATTAGTCGAACCACAATAAATTTGTTATGTTCTTTTGCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TTCAAAGTGGATGTAGGCACTATTAGTCGAACCACAATAAATTTGTTATGTTCTTTTGCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ------------------------AGTCGAACCACAATAAATTTGTTATGTTCTTTTGCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      ATTCCTTGTAATCTCCATAAATATTTTCTTACTAAGCTCTAGAAATCTGCTTGTCAAGAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ATTCCTTGTAATCTCCATAAATATTTTCTTACTAAGCTCTAGAAATCTGCTTGTCAAGAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ATTCCTTGTAATCTCCATAAATATTTTCTTACTAAGCTCTAGAAATCTGCTTGTCAAGAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      ATTAGGTATCATTTATGCCTTTTATATTTCCTTTCGGTTGCATATCTTGAGCTAGTTAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ATTAGGTATCATTTATGCCTTTTATATTTCCTTTCGGTTGCATATCTTGAGCTAGTTAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ATTAGGTATCATTTATGCCTTTTATATTTCCTTTCGGTTGCATATCTTGAGCTAGTTAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      ATCGAGAGGTTACTGTTGTTGAAACCGAGATTAGTATCTTTGGATTAACACGTGCCTACC
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ATCGAGAGGTTACTGTTGTTGAAACCGAGATTAGTATCTTTGGATTAACACGTGCCTACC
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ATCGAGAGGTTACTGTTGTTGAAACCGAGATTAGTATCTTTGGATTAACACGTGCCTACC
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      AAAATTTGAAATTTTGTATTTACCCCATTCATTGGATAATAAGCAATTCTTATAGTGTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      AAAATTTGAAATTTTGTATTTACCCCATTCATTGGATAATAAGCAATTCTTATAGTGTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      AAAATTTGAAATTTTGTATTTACCCCATTCATTGGATAATAAGCAATTCTTATAGTGTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TCAATTAAACTCCTATAAAGTGTAATAATTGAATCCATGAACTATTTTCATATGTAATCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TCAATTAAACTCCTATAAAGTGTAATAATTGAATCCATGAACTATTTTCATATGTAATCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TCAATTAAACTCCTATAAAGTGTAATAATTGAATCCATGAACTATTTTCATATGTAATCT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------
```


ФИГ. 1d

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TAATAAAATGAATTTAGAAGTTTAATTAAAATAATATATTTTGTATGCTATTTTTCAAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TAATAAAATGAATTTAGAAGTTTAATTAAAATAATATATTTTGTATGCTATTTTTCAAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TAATAAAATGAATTTAGAAGTTTAATTAAAATAATATATTTTGTATGCTATTTTTCAAAG
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TTTGAAGAATGTGTTAATTGATACACATACAAAAAATCTAGGTTTTACATGAAAAACTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TTTGAAGAATGTGTTAATTGATACACATACAAAAAATCTAGGTTTTACATGAAAAACTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TTTGAAGAATGTGTTAATTGATACACATACAAAAAATCTAGGTTTTACATGAAAAACTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ------------------------------------------------------------
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      GGAAGTGAAAGATAGCATCTAATATTTTATGACACAAAATGCAAACTAATATATAAAGGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      GGAAGTGAAAGATAGCATCTAATATTTTATGACACAAAATGCAAACTAATATATAAAGGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      GGAAGTGAAAGATAGCATCTAATATTTTATGACACAAAATGCAAACTAATATATAAAGGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ----------------------------TGACACAAAATGCAAACTAATATATAAAGGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TTTAATTAATTTTTATAGGTTTCAAATTTGTTAGACTTGTCAAATACAAAATTTTATTGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TTTAATTAATTTTTATAGGTTTCAAATTTGTTAGACTTGTCAAATACAAAATTTTATTGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TTTAATTAATTTTTATAGGTTTCAAATTTGTTAGACTTGTCAAATACAAAATTTTATTGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     TTTAATTAATTTTTATAGGTTTCAAATTTGTTAGACTTGTCAAATACAAAATTTTATTGA
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      ACCAAATACATACAAACATCAAAATTAAGAACAGAAAATCTAAATTCAAATGAAATTTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      ACCAAATACATACAAACATCAAAATTAAGAACAGAAAATCTAAATTCAAATGAAATTTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      ACCAAATACATACAAACATCAAAATTAAGAACAGAAAATCTAAATTCAAATGAAATTTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     ACCAAATACATACAAACATCAAAATTAAGAACAGAAAATCTAAATTCAAATGAAATTTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TAATAGAAAAATTAGAAAAAAGAAAAAGAAAATAAAAGGAATCGTATTGTTTTTTCCTTC
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TAATAGAAAAATTAGAAAAAAGAAAAAGAAAATAAAAGGAATCGTATTGTTTTTTCCTTC
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TAATAGAAAAATTAGAAAAAAGAAAAAGAAAATAAAAGGAATCGTATTGTTTTTTCCTTC
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     TAATAGAAAAATTAGAAAAAAGAAAAAGAAAATAAAAGGAATCGTATTGTTTTTTCCTTC
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------
```


ФИГ. 1e

```
P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CTTTTTCCCATTTGAGAGGTGAATAAAGCTAATTGAGCTGCTCTAACTTCCTAATCTTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      CTTTTTCCCATTTGAGAGGTGAATAAAGCTAATTGAGCTGCTCTAACTTCCTAATCTTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      CTTTTTCCCATTTGAGAGGTGAATAAAGCTAATTGAGCTGCTCTAACTTCCTAATCTTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     CTTTTTCCCATTTGAGAGGTGAATAAAGCTAATTGAGCTGCTCTAACTTCCTAATCTTTA
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ------------------------------------------------------------

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      TGCTTTCCCCATAAAGCTTTCCCAACTGCGCGTAATCGTATAAATGGAAAATTGACCTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      TGCTTTCCCCATAAAGCTTTCCCAACTGCGCGTAATCGTATAAATGGAAAATTGACCTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      TGCTTTCCCCATAAAGCTTTCCCAACTGCGCGTAATCGTATAAATGGAAAATTGACCTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     TGCTTTCCCCATAAAGCTTTCCCAACTGCGCGTAATCGTATAAATGGAAAATTGACCTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     ----------------------------------TCGTATAAATGGAAAATTGACCTTT

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CCAACTAGATTCTTCCAGAACTAAACAATACGTAACACGCAAGTAATCAAAGACACGTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      CCAACTAGATTCTTCCAGAACTAAACAATACGTAACACGCAAGTAATCAAAGACACGTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      CCAACTAGATTCTTCCAGAACTAAACAATACGTAACACGCAAGTAATCAAAGACACGTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     CCAACTAGATTCTTCCAGAACTAAACAATACGTAACACGCAAGTAATCAAAGACACGTTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     CCAACTAGATTCTTCCAGAACTAAACAATACGTAACACGCAAGTAATCAAAGACACGTTT

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      CATTTTCCTATAGAATATTATAGTTATTCGTGATTAACGGAAGTCGGCAATTTTAGGTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      CATTTTCCTATAGAATATTATAGTTATTCGTGATTAACGGAAGTCGGCAATTTTAGGTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      CATTTTCCTATAGAATATTATAGTTATTCGTGATTAACGGAAGTCGGCAATTTTAGGTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     CATTTTCCTATAGAATATTATAGTTATTCGTGATTAACGGAAGTCGGCAATTTTAGGTAT
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     CATTTTCCTATAGAATATTATAGTTATTCGTGATTAACGGAAGTCGGCAATTTTAGGTAT

P-CUCme.Ubq1-1:1:15 (SEQ ID NO: 2)      AAATACGTGAATTCTCGAGCGCTAATTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:16 (SEQ ID NO: 6)      AAATACGTGAATTCTCGAGCGCTAATTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:17 (SEQ ID NO: 8)      AAATACGTGAATTCTCGAGCGCTAATTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:18 (SEQ ID NO: 10)     AAATACGTGAATTCTCGAGCGCTAATTT
P-CUCme.Ubq1-1:1:19 (SEQ ID NO: 12)     AAATACGTGAATTCTCGAGCGCTAATTT
```


ФИГ. 1f