

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192904** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.29

(22) Дата подачи заявки
2017.03.08

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/306,790**

(32) **2016.03.11**

(33) **US**

(62) **201892043; 2017.03.08**

(71) Заявитель:
**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС
(US)**

(72) Изобретатель:
**Читтоор Джаишри М., Фласинский
Станислав, Оуфаттоле Мохаммед,
Петерсен Майкл В. (US)**

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

(57) Изобретение обеспечивает молекулы и конструкции рекомбинантных ДНК, а также их нуклеотидные последовательности, подходящие для модуляции экспрессии генов в растениях. Изобретение также обеспечивает трансгенные растения, растительные клетки, части растений и семена, содержащие молекулы рекомбинантной ДНК, функционально связанные с гетерологичными транскрибируемыми молекулами ДНК, а также способы их применения.

202192904
A1

202192904

A1

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/306790, поданной 11 марта 2016 года, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Перечень последовательностей, который содержится в файле с названием «MONS417WO-sequence_listing», размер которого составляет 29,4 кБ (измерено в Microsoft Windows®) и который был создан 6 марта 2017 года, подан вместе с настоящей заявкой в электронном виде и включен в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к молекулам ДНК, подходящим для модуляции экспрессии генов в растениях.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Регуляторные элементы представляют собой генетические элементы, которые регулируют активность генов путем модуляции транскрипции функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Такие элементы могут включать промоторы, лидеры, интроны и 3'-нетранслируемые области, и их можно применять в области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение обеспечивает новые генные регуляторные элементы для применения в растениях. Настоящее изобретение также обеспечивает конструкции ДНК, содержащие регуляторные элементы. Настоящее изобретение также обеспечивает трансгенные растительные клетки, растения и семена, содержащие регуляторные элементы. В одном варианте реализации регуляторные элементы функционально связаны с транскрибируемой молекулой ДНК.

В некоторых вариантах реализации транскрибируемая молекула ДНК может быть гетерологичной по отношению к регуляторной последовательности. Таким образом, последовательность регуляторных элементов согласно настоящему изобретению, в конкретных вариантах реализации можно определить как функционально связанную с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения и применения регуляторных элементов, конструкций ДНК, содержащих регуляторные элементы, и трансгенных растительных клеток, растений и семян, содержащих регуляторные элементы, функционально связанные с транскрибируемой молекулой ДНК.

[0006] Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (a) последовательности с по меньшей мере примерно 85% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID №: 1-15; (b) последовательности, содержащей любую из последовательностей SEQ ID №: 1-15; и (c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID №: 1-15, причем указанный фрагмент обладает регулирующей гены активностью; при этом указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Под «гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК» подразумевается, что транскрибируемая молекула ДНК является гетерологичной по отношению к полинуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. В конкретных вариантах реализации рекомбинантная молекула ДНК содержит последовательность ДНК, обладающую по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности к последовательности ДНК любой из последовательностей SEQ ID №: 1-15. В некоторых вариантах реализации последовательность ДНК содержит регуляторный элемент. В некоторых вариантах реализации регуляторный элемент содержит промотор. В других вариантах реализации гетерологичная транскрибируемая молекула ДНК содержит ген, представляющий

интерес с точки зрения агрономии, как, например, ген, обладающий способностью обуславливать устойчивость растений к гербицидам, или ген, обладающий способностью обуславливать устойчивость растений к вредителям растений. В других вариантах реализации настоящего изобретения предложена конструкция, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК, предложенную в настоящем документе.

[0007] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает трансгенные растительные клетки, содержащие рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (a) последовательности с по меньшей мере примерно 85% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID №: 1-15; (b) последовательности, содержащей любую из последовательностей SEQ ID №: 1-15; и (c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID №: 1-15, причем указанный фрагмент обладает регулирующей гены активностью; при этом указанная последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. В некоторых вариантах реализации трансгенная растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения. В других вариантах реализации трансгенная растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения или клетку двудольного растения.

[0008] В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно обеспечивает трансгенное растение или его часть, которые содержат рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (a) последовательности с по меньшей мере примерно 85% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID №: 1-15; (b) последовательности, содержащей любую из последовательностей SEQ ID №: 1-15; и (c) фрагмента любой из последовательностей SEQ ID №: 1-15, причем указанный фрагмент обладает регулирующей гены активностью; при этом указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. В конкретных вариантах реализации трансгенное растение представляет собой растение-потомок любого поколения, которое содержит рекомбинантную молекулу ДНК. Трансгенное семя, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК, из которого образуется

такое трансгенное растение при выращивании, также предложено в настоящем описании.

[0009] В еще другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения продукта потребления, включающий получение трансгенного растения или его части, содержащей рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению, и получение из него указанного продукта потребления. В одном варианте реализации указанный продукт потребления представляет собой обработанные семена, зерна, части растений, масла и шрот (meal).

[0010] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения трансгенного растения, содержащего рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению, включающий трансформацию растительной клетки молекулой рекомбинантной ДНК согласно настоящему изобретению для получения трансформированной растительной клетки и регенерацию трансгенного растения из указанной трансформированной растительной клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0011] SEQ ID №: 1 представляет собой последовательность ДНК группы регуляторных элементов экспрессии (EXP), содержащую промотор, полученный из гена белка ферредоксина 2 (Fe2) дыни (*Cucumis melo*), функционально связанный с 5'-концом своего нативного лидера.

[0012] SEQ ID №: 2 представляет собой промоторную последовательность, полученную из предполагаемого гена белка ферредоксина 2 (Fe2) *Cucumis melo*.

[0013] SEQ ID №: 3 представляет собой лидерную последовательность, полученную из предполагаемого гена белка ферредоксина 2 (Fe2) *Cucumis melo*.

[0014] SEQ ID №: 4 представляет собой последовательность ДНК EXP, содержащую промотор, полученный из гена белка 13 *Cucumis melo*, связывающего хлорофилл а-в, функционально связанный с 5'-концом своего нативного лидера.

[0015] SEQ ID №: 5 представляет собой промоторную последовательность, полученную из гена белка 13 *Cucumis melo*,

связывающего хлорофилл a-b.

[0016] SEQ ID №: 6 представляет собой лидерную последовательность, полученную из гена белка 13 *Cucumis melo*, связывающего хлорофилл a-b.

[0017] SEQ ID №: 7 представляет собой последовательность ДНК EXP, содержащую промотор, полученный из гена белка, белку 24, содержащему домен "цинковые пальцы" типа B-box, *Cucumis melo*, функционально связанный с 5'-концом своего нативного лидера.

[0018] SEQ ID №: 8 представляет собой промоторную последовательность, полученную из гена белка, белку 24, содержащему домен "цинковые пальцы" типа B-box, *Cucumis melo*.

[0019] SEQ ID №: 9 представляет собой лидерную последовательность, полученную из гена белка, белку 24, содержащему домен "цинковые пальцы" типа B-box, *Cucumis melo*.

[0020] SEQ ID №: 10 представляет собой последовательность ДНК EXP, содержащую промотор, полученный из гена белка b2 светопоглощающего комплекса люцерны усеченной (*Medicago truncatula*), функционально связанный с 5'-концом своего нативного лидера.

[0021] SEQ ID №: 11 представляет собой промоторную последовательность, полученную из гена белка b2 светопоглощающего комплекса *Medicago truncatula*.

[0022] SEQ ID №: 12 представляет собой лидерную последовательность, полученную из гена белка b2 светопоглощающего комплекса *Medicago truncatula*.

[0023] SEQ ID №: 13 представляет собой последовательность ДНК EXP, содержащую промотор, полученный из гена предшественника хлоропластов фотосистемы II *Medicago truncatula*, функционально связанный с 5'-концом своего нативного лидера.

[0024] SEQ ID №: 14 представляет собой промоторную последовательность, полученную из гена предшественника хлоропластов фотосистемы II *Medicago truncatula*.

[0025] SEQ ID №: 15 представляет собой лидерную последовательность, полученную из гена предшественника хлоропластов фотосистемы II *Medicago truncatula*.

[0026] SEQ ID №: 16 представляет собой энхансерную последовательность, полученную из промотора гена белка b2 светопоглощающего комплекса *Medicago truncatula*.

[0027] SEQ ID №: 17 представляет собой кодирующую последовательность для β -глюкуронидазы (GUS), содержащую процессируемый интрон.

[0028] SEQ ID №: 18 представляет собой последовательность 3'-НТО, полученную из гена Е6 хлопчатника барбадосского (*Gossypium barbadense*).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0029] Настоящее изобретение обеспечивает молекулы ДНК, обладающие регулирующей гены активностью в растениях. Нуклеотидные последовательности таких молекул ДНК представлены в виде SEQ ID №: 1-15. Эти молекулы ДНК обладают способностью воздействовать на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК в тканях растений и, следовательно, регулировать экспрессию гена функционально связанного трансгена в трансгенных растениях. Настоящее изобретение также обеспечивает способы модификации, получения и применения таких молекул. Настоящее изобретение также обеспечивает композиции, которые содержат трансгенные растительные клетки, растения, части растений и семена, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК согласно настоящему изобретению, а также способы их получения и применения.

[0030] Следующие определения и способы предложены для лучшего определения настоящего изобретения и для обеспечения руководства для специалистов в данной области техники при осуществлении настоящего изобретения. Если не указано иное, термины следует понимать соответственно обычному их применению специалистами в соответствующей области техники.

Молекулы ДНК

[0031] В настоящем описании термин «ДНК» или «молекула ДНК» относится к двухцепочечной молекуле ДНК геномного или синтетического происхождения, т.е. к полимеру дезоксирибонуклеотидных оснований, или молекуле ДНК, читаемой от

5'-конца (расположенному выше) к 3'-концу (расположенному ниже). В настоящем описании термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Применяемая в настоящем документе номенклатура соответствует номенклатуре Раздела 37 1.822 Свода федеральных нормативных актов США и изложенным в таблицах стандартам ВОИС ST.25 (1998), Приложение 2, Таблицы 1 и 3.

[0032] В настоящем описании термин «рекомбинантная молекула ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые в природе не встречаются совместно без вмешательства человека. Например, рекомбинантная молекула ДНК может представлять собой молекулу ДНК, которая состоит из по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных относительно друг друга, молекулу ДНК, которая содержит последовательность ДНК, отличную от последовательностей ДНК, которые существуют в природе, или молекулу ДНК, которую ввели в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генома.

[0033] В настоящем описании термин «идентичность последовательности» относится к степени идентичности двух оптимально выровненных полинуклеотидных последовательностей или двух оптимально выровненных полипептидных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей создается путем выравнивания вручную двух последовательностей, например, референсной последовательности и другой последовательности, для максимизации числа нуклеотидных совпадений при выравнивании последовательности с соответствующими внутренними нуклеотидными вставками, делециями или гэпами (пропусками). В настоящем описании термин «референсная последовательность» относится к последовательности ДНК, предложенной в виде последовательности ДНК, представленной в виде SEQ ID №: 1-15.

[0034] В настоящем описании термин «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности» или «% идентичности» представляет собой долю идентичности, умноженную на 100. «Доля идентичности» для последовательности, оптимально выровненной с референсной последовательностью, представляет собой число нуклеотидных совпадений при оптимальном

выравнивании, поделенное на общее число нуклеотидов в референсной последовательности, например, общее количество нуклеотидов целой полноразмерной референсной последовательности. Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена молекула ДНК, содержащая последовательность, которая при оптимальном выравнивании с референсной последовательностью, представленной в настоящем документе в виде SEQ ID №: 1-15, обладает по меньшей мере примерно 85-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 86-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 87-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 88-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 89-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 90-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 91-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 92-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 93-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 94-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 95-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 96-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 97-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 98-процентной идентичностью, по меньшей мере примерно 99-процентной идентичностью или по меньшей мере примерно 100-процентной идентичностью к референсной последовательности.

Регуляторные элементы

[0035] Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидеры (также известные как 5'-НТО), энхансеры, интроны и области терминации транскрипции (или 3'-НТО), играют неотъемлемую роль в общей экспрессии генов в живых клетках. В настоящем описании термин «регуляторный элемент» относится к молекуле ДНК, обладающей регулирующей гены активностью. В настоящем описании термин «регулирующая гены активность» относится к способности влиять на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК, например, путем влияния на транскрипцию и/или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Таким образом, регуляторные элементы, такие как промоторы,

лидеры, энхансеры, интроны и 3'-НТО, которые функционируют в растениях, являются подходящими для модификации фенотипов растений посредством генной инженерии.

[0036] В настоящем описании термин последовательность «группы регуляторных элементов экспрессии» или «EXR» может относиться к группе функционально связанных регуляторных элементов, таких как энхансеры, промоторы, лидеры и интроны. Таким образом, группа регуляторных элементов экспрессии может включать, например, промотор, функционально связанный с 5'-концом лидерной последовательности. EXR, подходящая для осуществления настоящего изобретения, включает SEQ ID №: 1, 4, 7, 10 и 13.

[0037] Регуляторные элементы можно охарактеризовать по их профилю экспрессии гена, например, по положительным и/или отрицательным эффектам, таким как конститутивная экспрессия или транзистентная, пространственная, относящаяся к развитию, тканевая, экологическая, физиологическая, патологическая, относящаяся к клеточному циклу и/или чувствительная к химическому воздействию экспрессия, и любой их комбинации, а также по количественным или качественным показателям. В настоящем описании термин «профиль экспрессии генов» представляет собой любой профиль транскрипции функционально связанной молекулы ДНК в транскрибируемую молекулу РНК. Можно осуществить трансляцию транскрибируемой молекулы РНК с получением молекулы белка или можно получить антисмысловую или другую регуляторную молекулу РНК, такую как двухцепочечная РНК (дцРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомальная РНК (рРНК), микроРНК и им подобные.

[0038] В настоящем описании термин «экспрессия белка» представляет собой любой профиль трансляции транскрибируемой молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессию белка можно охарактеризовать по ее транзистентным, пространственным, относящимся к развитию или морфологическим качествам, а также по количественным или качественным показателям.

[0039] Промотор можно применять в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной

транскрибируемой молекулы ДНК. В настоящем описании термин «промотор» в целом относится к молекуле ДНК, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы II и других белков, таких как транс-действующие факторы транскрипции, для инициации транскрипции. Промотор можно изначально выделить из 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) геномной копии гена. В качестве альтернативы, промоторы могут представлять собой полученные синтетически или подвергнутые манипуляциям молекулы ДНК. Промоторы также могут быть химерными. Химерные промоторы получают в результате слияния двух или более гетерологичных молекул ДНК. Промоторы, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают промоторные элементы, содержащиеся в любой из последовательностей SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения заявленные молекулы ДНК и любые их варианты или их производные, описанные в настоящем документе, также определяют как обладающие промоторной активностью, т.е. обладающие способностью действовать в качестве промотора в клетке-хозяине, как, например, в трансгенном растении. В других конкретных вариантах реализации фрагмент может быть определен как проявляющий промоторную активность, которой обладала исходная промоторная молекула, из которой он был получен, или фрагмент может содержать «минимальный промотор», который обеспечивает основной уровень транскрипции и состоит из ТАТА-бокса, другого известного мотива сайта связывания фактора транскрипции, или эквивалентной последовательности ДНК для распознавания и связывания комплекса РНК-полимеразы II для инициации транскрипции.

[0040] В одном варианте реализации предложены фрагменты промоторной последовательности, описанной в настоящем документе. Промоторные фрагменты могут обладать промоторной активностью, как это описано выше, и могут быть подходящими по отдельности или в комбинации с другими промоторами и промоторными фрагментами, как, например, при создании химерных промоторов, или в комбинации с другими EХР и EХР-фрагментами. В конкретных вариантах реализации предложены фрагменты промотора, содержащие

по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 75, по меньшей мере примерно 95, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 125, по меньшей мере примерно 150, по меньшей мере примерно 175, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 225, по меньшей мере примерно 250, по меньшей мере примерно 275, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 500, по меньшей мере примерно 600, по меньшей мере примерно 700, по меньшей мере примерно 750, по меньшей мере примерно 800, по меньшей мере примерно 900 или по меньшей мере примерно 1000 смежных нуклеотидов или более нуклеотидов молекулы ДНК, обладающие промоторной активностью, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает фрагменты любой одной из последовательностей SEQ ID №: 1-15, обладающие активностью полноразмерной последовательности. Способы получения таких фрагментов из исходной промоторной молекулы хорошо известны в данной области техники.

[0041] Композиции, полученные из любых промоторных элементов, содержащихся в любой из последовательности SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14, как, например, внутренние или 5'-делеции, можно получить с применением способов, известных в данной области техники, для улучшения или изменения экспрессии, в том числе путем удаления элементов, которые обладают либо положительным, либо отрицательным влиянием на экспрессию; дубликации (удвоения числа) элементов, которые обладают положительным или отрицательным влиянием на экспрессию; и/или дубликации или удаления элементов, которые обладают ткане- или клеточноспецифичным воздействием на экспрессию. Можно применять композиции, полученные из любых промоторных элементов, содержащихся в любой из последовательностей SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14, состоящих из 3'-делеций, в которых удален элемент ТАТА-бокса или его эквивалентная последовательность и расположенная ниже последовательность, например, для создания энхансерных элементов. Дополнительные делеции можно осуществить для удаления любых элементов, которые обладают положительным или отрицательным; тканеспецифичным; клеточноспецифичным или

специфичным по времени (таким как, циркадианный ритм, но не ограничиваясь им,) воздействием на экспрессию. Любой из промоторных элементов, содержащийся в любой из последовательностей SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14, и фрагменты или энхансеры, полученные из них, можно применять для получения композиций химерных транскрипционных регуляторных элементов.

[0042] В соответствии с настоящим изобретением промотор или промоторный фрагмент можно проанализировать на определение присутствия известных промоторных элементов, т.е. на определение характеристик последовательности ДНК, таких как TATA-бокс, и других известных мотивов сайта связывания фактора транскрипции. Идентификацию таких известных промоторных элементов может применять специалист в данной области техники для разработки вариантов промотора, обладающих аналогичным с исходным промотором профилем экспрессии.

[0043] В настоящем описании термин «лидер» относится к молекуле ДНК, выделенной из нетранслируемой 5'-области (5'-НТО) гена, и в целом его определяют как нуклеотидный сегмент между сайтом начала транскрипции (TSS) и сайтом начала кодирующей последовательности белка. В качестве альтернативы, лидеры могут представлять собой полученные синтетически или подвергнутые манипуляциям элементы ДНК. Лидер можно применять в качестве 5'-регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные молекулы можно применять с гетерологичным промотором или со своим нативным (собственным) промотором. Лидеры, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают последовательности SEQ ID №: 3, 6, 9, 12 и 15 или любой лидерный элемент, содержащийся в любой из последовательностей SEQ ID №: 1, 4, 7, 10 и 13, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах реализации такие последовательности ДНК можно определить как обладающие способностью действовать в качестве лидера в клетке-хозяине, включая, например, трансгенную растительную клетку. В одном варианте реализации такие последовательности расшифрованы как обладающие лидерной активностью.

[0044] Лидерные последовательности (также называемые 5'-

НТО), представленные в виде SEQ ID №: 3, 6, 9, 12 и 15 или любого лидерного элемента, содержащегося в любой из последовательностей SEQ ID №: 1, 4, 7, 10 и 13, могут состоять из регуляторных элементов или могут принимать вторичные структуры, которые могут влиять на транскрипцию или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные последовательности, представленные в виде SEQ ID №: 3, 6, 9, 12 и 15 или любого лидерного элемента, содержащегося в любой из последовательностей SEQ ID №: 1, 4, 7, 10 и 13, можно применять в соответствии с настоящим изобретением для получения химерных регуляторных элементов, которые влияют на транскрипцию или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК.

[0045] В настоящем описании термин «интрон» относится к молекуле ДНК, которую можно выделить или идентифицировать из гена, и в целом его можно определить как область, сплайсированную во время процессинга матричной РНК (мРНК) перед трансляцией. В качестве альтернативы, интрон может представлять собой полученный синтетический или подвергнутый манипуляциям элемент ДНК. Интрон может содержать энхансерные элементы, которые влияют на транскрипцию функционально связанных генов. Интрон можно применять в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Конструкция может содержать интрон, и указанный интрон может быть или может не быть гетерологичным по отношению к транскрибируемой молекуле ДНК. Примеры интронов в данной области техники включают интрон актина риса и интрон HSP70 кукурузы.

[0046] В растениях включение некоторых интронов в генные конструкции приводит к увеличению накопления мРНК и белка по сравнению с конструкциями без интрона. Этот эффект был назван «опосредованное интроном усиление» (IME) экспрессии гена. Интроны, о которых известно, что они стимулируют экспрессию в растениях, идентифицированы в генах кукурузы (например, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* и *Ubi1*), в генах риса (например, *tpi*) и в генах двудольных растений, таких как гены, полученные из петунии

(например, *rbcS*), картофеля (например, *st-ls1*) и *Arabidopsis thaliana* (например, *ubq3* и *pat1*). Было показано, что делеции или мутации в сайтах сплайсинга интрона понижают экспрессию гена, что свидетельствует о том, что для ИМЕ может быть необходим сплайсинг. Однако, в двудольных растениях было продемонстрировано ИМЕ при мутациях в сайтах сплайсинга гена *pat1* из *A. thaliana*. Было показано, что множественное применение одного и того же интрона на одном растении имеет недостатки. В таких случаях необходимо наличие набора основных контрольных элементов для создания соответствующих элементов рекомбинантных ДНК.

[0047] В настоящем описании термины «3'-молекула терминации транскрипции», «3'-нетранслируемая область» или «3'-НТО» (3-UTR) относятся к молекуле ДНК, которая применяется во время транскрипции для получения нетранслируемой области 3'-участка мРНК. 3'-нетранслируемая область молекулы мРНК может быть образована специфическим расщеплением и 3'-полиаденилированием, также известным как полиА-хвост. 3'-НТО может быть функционально связана с и располагаться ниже транскрибируемой молекулы ДНК, и может содержать сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, обладающие способностью влиять на транскрипцию, процессинг мРНК или экспрессию гена. Считается, что полиА-хвосты задействованы в стабильности мРНК и инициации трансляции. Примерами 3'-молекул терминации транскрипции в данной области техники являются 3'-область нопалинсинтазы; 3'-область *hsp17* пшеницы, небольшая субъединица 3'-области гороха, 3'-область *E6* хлопка и 3'-НТО коиксина.

[0048] 3'-НТО обычно находят полезное применение для рекомбинантной экспрессии специфичных молекул ДНК. Слабая 3'-НТО обладает потенциалом для создания сквозного прочтения, что может влиять на экспрессию молекулы ДНК, расположенной в соседних кассетах экспрессии. Соответствующий контроль за терминацией транскрипции может препятствовать сквозному прочтению в последовательностях ДНК (например, в других кассетах экспрессии), расположенных ниже, и может также способствовать эффективному рециклингу РНК-полимеразы для улучшения экспрессии

генов. Эффективная терминация транскрипции (высвобождение РНК-полимеразы II из ДНК) является предпосылкой для повторной инициации транскрипции и, таким образом, непосредственно влияет на общий уровень транскрипта. После терминации транскрипции зрелая мРНК высвобождается из сайта синтеза и переносится в цитоплазму. Эукариотические мРНК накапливаются в виде поли(А)-форм *in vivo*, что затрудняет обнаружение сайтов терминации транскрипции обычными способами. Тем не менее, прогнозирование функциональных и эффективных 3'-НТО при помощи биоинформационных способов затруднено вследствие отсутствия консервативных последовательностей ДНК, которые бы позволили легко прогнозировать эффективную 3'-НТО.

[0049] С практической точки зрения обычно полезно, чтобы 3'-НТО, применяемая в кассете экспрессии, обладала следующими характеристиками. 3'-НТО должна обладать возможностью эффективно и результативно терминировать транскрипцию транстена и предотвращать сквозное прочтение транскрипта в любой соседней последовательности ДНК, которая может содержать другую кассету экспрессии, как в случае нескольких кассет экспрессии, расположенных в одной транспортной ДНК (Т-ДНК), или в соседней хромосомной ДНК, в которую встроена Т-ДНК. 3'-НТО не должна вызывать снижения транскрипционной активности, обусловленной промотором, лидером, энхансером и интронами, которые применяются для опосредования экспрессии молекулы ДНК. В биотехнологии растений 3'-НТО часто применяют для праймирования реакций амплификации обратно транскрибируемой РНК, выделенной из трансформированного растения, и применяют для: (1) оценки транскрипционной активности или экспрессии кассеты экспрессии после интегрирования в хромосому растения; (2) оценки числа копий вставок в ДНК растения; и (3) оценки зиготности полученного семени после селекции. 3'-НТО также применяют в реакциях амплификации ДНК, выделенной из трансформированного растения, для характеристики сохранности встроенной кассеты.

[0050] В настоящем описании термин «энхансер» или «энхансерный элемент» относится к цис-действующему регуляторному элементу, также известному как цис-элемент, который

обуславливает аспект общего профиля экспрессии, однако который сам по себе обычно не является достаточным для опосредования транскрипции функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. В отличие от промоторов, энхансерные элементы обычно не содержат сайт начала транскрипции (TSS) или TATA-бокс или эквивалентную последовательность ДНК. Промотор или промоторный фрагмент в природе может содержать по меньшей мере один энхансерный элемент, который влияет на транскрипцию функционально связанной последовательности ДНК. Энхансерный элемент также может быть слит с промотором для получения цис-элемента химерного промотора, который обуславливает аспект общей модуляции экспрессии гена. Пример энхансерного элемента, полученного из промотора гена предшественника белка b2 светопоглощающего комплекса *Medicago truncatula*, представлен в SEQ ID №: 16.

[0051] Считается, что многие промоторные энхансерные элементы связывают ДНК-связывающие белки и/или влияют на топологию ДНК, производя локальные конформации, которые избирательно позволяют осуществить доступ или ограничивают доступ РНК-полимеразы к ДНК-матрице, или которые облегчают селективное раскрытие двойной спирали на сайте инициации транскрипции. Энхансерный элемент может действовать, связывая факторы транскрипции, которые регулируют транскрипцию. Некоторые энхансерные элементы связывают более одного фактора транскрипции, и факторы транскрипции могут взаимодействовать с различными аффинностями с более чем одним энхансерным доменом. Энхансерные элементы можно идентифицировать с использованием ряда методов, включая анализ на определение делеций, т.е. на определение делеции (удаления) по меньшей мере одного нуклеотида с 5'-конца или с середины в направлении промотора; анализ на определение ДНК-связывающих белков с применением футпринтинга с ДНКазой I, интерференцию участков метилирования, анализ сдвига электрофоретической подвижности, геномный футпринтинг *in vivo* путем опосредованной лигированием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и другие традиционные анализы; или путем анализа сходства последовательности ДНК с использованием известных мотивов цис-

элементов или энхансерных элементов в качестве последовательности-мишени или мотива-мишени при помощи обычных способов сравнения последовательностей ДНК, таких как BLAST. Тонкую структуру энхансерного домена можно также изучать путем мутагенеза (или замещения) по меньшей мере одного нуклеотида или при помощи других традиционных способов в данной области техники. Энхансерные элементы можно получить путем химического синтеза или путем выделения из регуляторных элементов, которые содержат такие элементы, и их можно синтезировать при помощи дополнительных фланкирующих нуклеотидов, которые содержат подходящие сайты для ферментов рестрикции, что облегчает манипуляции с подпоследовательностью. Таким образом, разработка, конструирование и применение энхансерных элементов согласно описанным в настоящем документе способам для модуляции экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК охватываются настоящим изобретением.

[0052] В настоящем описании термин «химерный» относится к отдельной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, при этом ни указанная первая, ни указанная вторая молекула ДНК обычно не встречаются в такой конфигурации, т.е. они слиты друг с другом. Таким образом, молекула химерной ДНК представляет собой новую молекулу ДНК, которая обычно не встречается в природе. В настоящем описании термин «химерный промотор» относится к промотору, полученному в результате такой манипуляции с молекулами ДНК. Химерный промотор может объединять два или более фрагментов ДНК; например, слияние промотора с энхансерным элементом. Таким образом, разработка, конструирование и применение химерных промоторов согласно описанным в настоящем документе способам для модуляции экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК охватываются настоящим изобретением.

[0053] Химерные регулирующие элементы могут быть выполнены таким образом, чтобы они содержали различные составляющие элементы, которые могут быть функционально связаны различными способами, известными в данной области техники, такими как расщепление ферментами рестрикции и лигирование, клонирование,

независимое от лигирования, модульная сборка продуктов ПЦР во время амплификации или прямой химический синтез регуляторного элемента, а также другими способами, известными в данной области техники. Образующиеся в результате различные химерные регуляторные элементы могут состоять из одного и того же или вариантов одних и тех же составляющих элементов, но различаются в последовательности ДНК или в последовательностях ДНК, которые содержат связывающую ДНК-последовательность или последовательности, которые способствуют тому, чтобы составляющие части были функционально связаны. В настоящем изобретении последовательность ДНК, представленная в виде SEQ ID №: 1-15, может обеспечивать референсную последовательность регуляторного элемента, при этом составляющие элементы, которые содержат указанную референсную последовательность, могут быть соединены способами, известными в данной области техники, и могут содержать замены, делеции и/или вставки по меньшей мере одного нуклеотида или мутации, которые в природе происходят при трансформации бактериальных и растительных клеток.

[0054] В настоящем описании термин «вариант» относится ко второй молекуле ДНК, как, например, регуляторному элементу, которая по своему составу сходна, но не идентична первой молекуле ДНК, и при этом указанная вторая молекула ДНК все еще сохраняет общую функциональность, т.е. тот же или близкий профиль экспрессии, например, в результате большей или меньшей эквивалентной транскрипционной активности, первой молекуле ДНК. Вариант может представлять собой укороченную или усеченную версию указанной первой молекулы ДНК и/или измененный вариант последовательности указанной первой молекулы ДНК, как, например, с различными сайтами ферментов рестрикции и/или внутренними делециями, заменами и/или вставками. Термин «вариант» также включает регуляторный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность, содержащую замены, делецию и/или вставку по меньшей мере одного нуклеотида референсной последовательности, при этом производное регуляторного элемента обладает большей или меньшей или эквивалентной транскрипционной или трансляционной активностью, чем соответствующая родительская регуляторная

молекула. «Варианты» регуляторного элемента также охватывают варианты, связанные с мутациями, которые в природе происходят при трансформации бактериальных и растительных клеток. В настоящем изобретении полинуклеотидную последовательность, представленную в виде SEQ ID №: 1-15, можно применять для создания вариантов, которые сходны по составу, но не идентичны последовательности ДНК исходного регуляторного элемента, сохраняя при этом общую функциональность, т.е. один и тот же или аналогичный профиль экспрессии, исходного регуляторного элемента. Получение таких вариантов согласно настоящему изобретению хорошо известно специалистам в данной области техники в свете описания настоящего изобретения и входит в его объем.

[0055] В данной заявке «выделенной молекулы ДНК» или эквивалентный термин или фразу означает, что молекула ДНК представляет собой такую молекулу ДНК, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не в своей естественной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и им подобные, которые встречаются в природе в ДНК генома организма, не считаются «выделенными», если указанный элемент присутствует в геноме организма и находится в участке генома, в котором он встречается в природе. Однако каждый из таких элементов и часть таких элементов будут «выделенными» в объеме данного описания, если указанный элемент не присутствует в геноме организма и в участке генома, в котором он встречается в природе. Для целей настоящего описания любая трансгенная нуклеотидная последовательность, т.е. нуклеотидная последовательность ДНК, встроенная в геном растительных или бактериальных клеток, или присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она в плазмиде или подобной структуре, применяемой для трансформации клеток, в геноме указанного растения или бактерии, или

присутствует ли она в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из указанного растения или бактерии.

[0056] Эффективность модификаций, дупликаций или делеций, описанных в настоящем документе, в отношении желаемых аспектов экспрессии конкретного трансгена, можно исследовать эмпирически в анализах на определение стабильной и транзIENTной экспрессии у растений, как, например, тех, которые описаны в рабочих примерах настоящего документа, для подтверждения результатов, которые могут варьироваться в зависимости от произведенных изменений и цели изменения в исходной молекуле ДНК.

Конструкции

[0057] В настоящем описании термин «конструкция» означает любую рекомбинантную молекулу ДНК, такую как плаزمид, космид, вирус, фаг, или молекулу линейной или кольцевой ДНК или РНК, полученную из любого источника, обладающую способностью к интеграции в геном или автономной репликации, включая молекулу ДНК, в которой по меньшей мере одна молекула ДНК связана с другой молекулой ДНК функционально оперативным образом, т.е. связана функционально. В настоящем описании термин «вектор» означает любую конструкцию, которую можно применять для целей трансформации, т.е. введения гетерологичной ДНК или РНК в клетку-хозяина. Конструкция обычно содержит по меньшей мере одну кассету экспрессии. В настоящем описании «кассета экспрессии» относится к молекуле ДНК, содержащей по меньшей мере транскрибируемую молекулу ДНК, функционально связанную с по меньшей мере одним регуляторным элементом, обычно с по меньшей мере промотором и 3'-НТО.

[0058] В настоящем описании термин «функционально связанный» относится к первой молекуле ДНК, присоединенной ко второй молекуле ДНК, при этом указанная первая и вторая молекулы ДНК расположены так, что указанная первая молекула ДНК влияет на функцию указанной второй молекулы ДНК. Две молекулы ДНК могут являться или могут не являться частью единой непрерывной молекулы ДНК, и могут быть или могут не быть смежными. Например, промотор функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК в

случае, если указанный промотор модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой молекулы ДНК в клетке. Лидер, например, функционально связан с последовательностью ДНК в случае, когда он обладает способностью влиять на транскрипцию или трансляцию последовательности ДНК.

[0059] Конструкции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в одном варианте реализации в виде конструкций с индуцирующими опухоль (Ti) двойными плазмидными границами, которые имеют области правой границы (RB или AGRtu.RB) и левой границы (LB или AGRtu.LB) Ti-плазмиды, выделенной из *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей Т-ДНК, которые наряду с молекулами переноса, обеспечиваемыми клетками *A. tumefaciens*, обеспечивают интеграцию Т-ДНК в геном растительной клетки (см., например, патент США № 6603061). Конструкции могут также содержать плазмидные каркасные сегменты ДНК, которые обеспечивают функцию репликации и селекцию по антибиотику в бактериальных клетках, например, точка начала репликации у *Escherichia coli*, такая как ori322, точка начала репликации широкого круга хозяев, такая как oriV или oriRi, и кодирующая область для селектируемого (отбираемого) маркера, как, например, Spec/Strp, которая кодирует Tn7-аминогликозидаденилтрансферазу (aadA), которая обуславливает устойчивость к спектиномицину или стрептомицину, или для селектируемого маркерного гена гентамицина (Gm, Gent). Для трансформации растений бактериальный штамм-хозяин часто представляет собой *A. tumefaciens* ABI, C58 или LBA4404; однако другие штаммы, известные специалистам в области трансформации растений, можно использовать в настоящем изобретении.

[0060] В данной области техники известны способы для сборки и введения конструкций в клетку так, что молекула транскрибируемой ДНК транскрибируется в функциональную молекулу мРНК, которая транслируется и экспрессируется в виде белка. Для осуществления настоящего изобретения традиционные композиции и способы получения и применения конструкций и клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники. Типичные векторы, которые являются подходящими для экспрессии нуклеиновых

кислот в высших растениях, хорошо известны в данной области техники и включают векторы, полученные из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, и вектор контроля переноса pCaMV CN.

[0061] В конструкцию могут быть включены различные регуляторные элементы, включая любые из представленных в настоящем документе элементов. Любые такие регуляторные элементы можно обеспечить в сочетании с другими регуляторными элементами. Такие комбинации можно разработать или модифицировать для получения требуемых регуляторных характеристик. В одном варианте реализации конструкции согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с транскрибируемой молекулой ДНК, функционально связанной с 3'-НТО

[0062] Конструкции согласно настоящему изобретению могут содержать любой промотор или лидер, предложенный в настоящем документе или известный в данной области техники. Например, промотор согласно настоящему изобретению может быть функционально связан с гетерологичным нетранслируемым 5'-лидером, как, например, таким, который получен из гена белка теплового шока. В качестве альтернативы, лидер согласно настоящему изобретению может быть функционально связан с гетерологичным промотором, таким как промотор транскрипта 35S вируса мозаичного вируса цветной капусты.

[0063] Кассеты экспрессии также могут содержать кодирующую транзитный пептид последовательность, которая кодирует пептид, подходящий для нацеливания во внутрь клетки функционально связанного белка, в частности, нацеливания на хлоропласт, лейкопласт или другую пластидную органеллу; митохондрии; пероксисому; вакуоль или внеклеточное пространство. Многие локализованные в хлоропластах белки экспрессируются с ядерных генов в качестве предшественников и нацеливаются на хлоропласт при помощи транзитного пептида хлоропластов (СТР). Примеры таких выделенных белков хлоропластов включают, но не ограничиваются ими, те белки, которые ассоциированы с малой субъединицей (SSU) рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксином, ферредоксиноксидоредуктазой, белком I и белком II

светопоглощающего комплекса, тиоредоксином F и энолпирувилликиматфосфатсинтазой (EPSPS). Транзитные пептиды хлоропластов описаны, например, в патенте США № 7193133. Было продемонстрировано, что не относящиеся к хлоропластам белки могут нацеливаться на хлоропласт путем экспрессии гетерологичного СТР, функционально связанного с трансгеном, кодирующим не относящимся к хлоропластам белки.

Транскрибируемые молекулы ДНК

[0064] В настоящем описании термин «транскрибируемая молекула ДНК» относится к любой молекуле ДНК, которая может транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, те молекулы, которые содержат кодирующие белок последовательности, и те молекулы, которые образуют молекулы РНК, содержащие последовательности, подходящие для супрессии (подавления) гена. Тип молекулы ДНК может включать, но не ограничиваться ими, молекулу ДНК, полученную из того же растения, молекулу ДНК, полученную из другого растения, молекулу ДНК, полученную из другого организма, или синтетическую молекулу ДНК, такую как молекулу ДНК, содержащую антисмысловую область гена, или молекулу ДНК, кодирующую искусственную, синтетическую или иным образом модифицированную версию трансгена. Примеры транскрибируемых молекул ДНК для введения в конструкции согласно настоящему изобретению включают, например, молекулы ДНК или гены, полученные из вида, отличного от вида, в который включены указанная молекула ДНК, или гены, которые присутствуют или происходят от одного и того же вида, но которые введены в клетки-реципиенты при помощи способов генной инженерии, а не классическими методами селекции.

[0065] «Трансген» относится к транскрибируемой молекуле ДНК, гетерологичной для клетки-хозяина, по меньшей мере, относительно ее положения в геноме указанной клетки-хозяина, и/или молекуле транскрибируемой ДНК, искусственно введенной в геном клетки-хозяина в текущем или любом предыдущем поколении клетки.

[0066] Регуляторный элемент, такой как промотор согласно настоящему изобретению, может быть функционально связан с

транскрибируемой молекулой ДНК, которая является гетерологичной по отношению к регуляторному элементу. В настоящем описании термин «гетерологичный» относится к комбинации двух или более молекул ДНК в случае, когда такая комбинация обычно не встречается в природе. Например, две молекулы ДНК можно получить из разных видов и/или две молекулы ДНК можно получить из разных генов, например, разных генов одного и того же вида или одних и тех же генов разных видов. Таким образом, регуляторный элемент является гетерологичным по отношению к функционально связанной транскрибируемой молекуле ДНК в случае, если такая комбинация обычно не встречается в природе, т.е. молекула транскрибируемой ДНК в природе может быть функционально не связана с регуляторным элементом.

[0067] Транскрибируемая молекула ДНК в целом может представлять собой любую молекулу ДНК, для которой требуется экспрессия транскрипта. Такая экспрессия транскрипта может приводить к трансляции полученной молекулы мРНК и, таким образом, к экспрессии белка. В качестве альтернативы, например, транскрибируемую молекулу ДНК могут быть выполнены таким образом, чтобы в конечном итоге вызвать понижение экспрессии конкретного гена или белка. В одном варианте реализации этого можно достигнуть с применением транскрибируемой молекулы ДНК, которая ориентирована в антисмысловом направлении. Специалист в данной области техники хорошо знаком с применением такой антисмысловой технологии. Любой ген можно негативно регулировать таким образом, и в одном варианте реализации транскрибируемую молекулу ДНК можно разработать для супрессии (подавления) специфичного гена посредством экспрессии молекулы дцРНК, миРНК или микроРНК.

[0068] Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения предложена рекомбинантная молекула ДНК, содержащая регуляторный элемент согласно настоящему изобретению, как, например, та, которая представлена в виде SEQ ID №: 1-15, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК таким образом, чтобы модулировать транскрипцию указанной транскрибируемой молекулы ДНК на требуемом уровне или

с требуемым профилем в случае, когда конструкция интегрирована в геном трансгенной растительной клетки. В одном варианте реализации указанная транскрибируемая молекула ДНК содержит кодирующую белок область гена, а в другом варианте реализации указанная транскрибируемая молекула ДНК содержит антисмысловую область гена.

Гены, представляющие интерес с точки зрения агрономии

[0069] Транскрибируемая молекула ДНК может представлять собой ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии. В настоящем описании термин «ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии» относится к транскрибируемой молекуле ДНК, которая при экспрессии в конкретной ткани растения, клетке или типе клеток, обуславливает требуемую характеристику. Продукт гена, представляющего интерес с точки зрения агрономии, может действовать внутри растения, оказывая воздействие на морфологию, физиологию, рост, развитие, урожайность, состав зерна, питательные характеристики, устойчивость к заболеваниям или вредителям и/или невосприимчивость к воздействию окружающей среды или химическим веществам у растений, или может действовать в качестве пестицидного агента в рационе вредителя, который питается на указанном растении. В одном варианте реализации настоящего изобретения регуляторный элемент согласно настоящему изобретению вводят в конструкцию таким образом, что указанный регуляторный элемент функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, которая представляет собой ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии. В трансгенном растении, содержащем такую конструкцию, экспрессия гена, представляющего интерес с точки зрения агрономии, может обуславливать наличие благоприятного с точки зрения агрономии признака. Благоприятный с точки зрения агрономии признак может включать, например, но не ограничиваться ими, невосприимчивость к гербицидам, борьбу с насекомыми-вредителями, модифицированную урожайность, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к патогенам, рост и развитие модифицированных растений, содержание модифицированного крахмала, содержание модифицированного масла, содержание модифицированных жирных кислот, содержание модифицированного

белка, созревание модифицированных плодов, улучшенное питание животных и человека, получение биополимеров, устойчивость к экологическому стрессу, фармацевтические пептиды, улучшенные характеристики обработки, улучшенный вкус, технологию получения гибридных семян, улучшенное получение волокна и получение требуемого биотоплива.

[0070] Примеры генов, представляющих интерес с точки зрения агрономии, известных в данной области, включают те гены, которые обеспечивают устойчивость к гербицидам (патенты США №№ 6803501, 6448476, 6248876, 6225114, 6107549, 5866775, 5804425, 5633435 и 5463175), повышенную урожайность (патенты США №№ USR38446, 6716474, 6663906, 6476295, 6441277, 6423828, 6399330, 6372211, 6235971, 6222098 и 5716837), борьбу с насекомыми-вредителями (патенты США №№ 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), устойчивость к грибковым заболеваниям (патенты США №№ 6653280, 6573361, 6506962, 6316407, 6215048, 5516671, 5773696, 6121436, 6316407 и 6506962), устойчивость к вирусам (патенты США №№ 6617496; 6608241; 6015940; 6013864; 5850023 и 5304730), устойчивость к нематодам (патент США № 6228992), устойчивость к бактериальным заболеваниям (патент США № 5516671), рост и развитие растений (патенты США №№ 6723897 и 6518488), получение крахмала (патенты США №№ 6538181 и 6538179; 6538178, 5750876, 6476295), получение модифицированных масел (патенты США №№ 6444876, 6426447 и 6380462), получение повышенного содержания масла (патенты США №№ 6495739, 5608149, 6483008 и 6476295), содержание модифицированных жирных кислот (патенты США №№ 6828475, 6822141, 6770465, 6706950, 6660849, 6596538, 6589767, 6537750, 6489461 и 6459018), получение повышенного содержания белка (патент США № 6380466), созревание плодов (патент США № 5512466), улучшенное питание животных и человека (патенты США №№ 6723837, 6653530, 6541259, 5985605 и 6171640), биополимеры (патенты США №№

USRE37543, 6228623 и 5958745, и 6946588), устойчивость к экологическому стрессу (патент США № 6072103), фармацевтические пептиды и секретируемые пептиды (патенты США №№ 6812379; 6774283; 6140075 и 6080560), улучшенные характеристики обработки (патент США № 6476295), улучшенную перевариваемость (патент США № 6531648), пониженное содержание рафинозы (патент США № 6166292), получение ферментов в промышленных масштабах (патент США № 5543576), улучшенный вкус (патент США № 6011199), фиксацию азота (патент США № 5229114), получение гибридных семян (патент США № 5689041), получение волокон (патенты США №№ 6576818, 6271443, 5981834 и 5869720) и получение биотоплива (патент США № 5998700).

[0071] В качестве альтернативы, ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии, может влиять на вышеупомянутые характеристики растений или фенотипы путем кодирования молекулы РНК, которая вызывает направленную модуляцию генной экспрессии эндогенного гена, например, при помощи антисмысловой (см., например, патент США №5107065); ингибирующей РНК («РНК-интерференция», включая модуляцию экспрессии гена посредством механизмов, опосредованных микроРНК, миРНК, транс-действующих миРНК и фазовой сРНК, например, как это описано в опубликованных заявках на патент США №№ 2006/0200878 и 2008/0066206, а также в заявке на патент США № 11/974469); или посредством механизмов, опосредованных косупрессией. РНК также может представлять собой каталитическую молекулу РНК (например, рибозимом или рибосвитч, см., например, патент США № 2006/0200878), модифицированную для расщепления требуемого эндогенного мРНК-продукта. В данной области техники известны способы для конструирования и введения конструкций в клетку таким образом, чтобы транскрибируемая молекула ДНК транскрибировалась в молекулу, которая обладает способностью вызывать супрессию гена.

Селектируемые маркеры

[0072] Селектируемые маркерные трансгены могут также применяться с регуляторными элементами согласно настоящему изобретению. В настоящем описании термин «селектируемый маркерный трансген» относится к любой транскрибируемой молекуле

ДНК, экспрессию которой (или ее отсутствие) в трансгенном растении, ткани или клетке можно выявить (при помощи скрининга) или оценить каким-либо образом. Селектируемые маркерные гены и ассоциированные с ними методы отбора и скрининга для применения при осуществлении настоящего изобретения известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, транскрибируемые молекулы ДНК, кодирующие β -глюкуронидазу (GUS), зеленый флуоресцентный белок (GFP), белки, которые обуславливают устойчивость к антибиотикам, и белки, которые обуславливают устойчивость к гербицидам. Примером селектируемого маркерного трансгена является трансген, представленный в виде SEQ ID №: 17.

Трансформация клеток

[0073] Настоящее изобретение также относится к способу получения трансформированных клеток и растений, которые содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с транскрибируемой молекулой ДНК.

[0074] Термин «трансформация» относится к введению молекулы ДНК в реципиента-хозяина. В настоящем описании термин «хозяин» относится к бактериям, грибам или растениям, включая любые клетки, ткани, органы или потомство бактерий, грибов или растений. Растительные клетки и ткани растений, представляющие особый интерес, включают протопласты, каллусы, корни, клубни, семена, стебли, листья, саженцы, зародыши и пыльцу.

[0075] В настоящем описании термин «трансформированный» относится к клетке, ткани, органу или организму, в который была введена чужеродная молекула ДНК, как, например, конструкция. Указанная введенная молекула ДНК может быть интегрирована в геномную ДНК реципиентной клетки, ткани, органа или организма, так что введенная молекула ДНК наследуется последующим потомством. «Трансгенная» или «трансформированная» клетка или организм может также включать потомство указанной клетки или организма и потомство, полученное в результате программ селекции с использованием такого трансгенного организма в качестве родителя при скрещивании, и проявляющее измененный фенотип, возникающий в результате присутствия чужеродной молекулы ДНК.

Указанную вводимую молекулу ДНК можно также транзиечно вводить в клетку-реципиент таким образом, чтобы вводимая молекула ДНК не наследовалась последующим потомством. Термин «транстенный» относится к бактерии, грибу или растению, содержащему по меньшей мере одну гетерологичную молекулу ДНК.

[0076] Существует множество способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, для введения молекул ДНК в растительные клетки. Обычно этот процесс включает стадии отбора подходящей клетки-хозяина, трансформации клетки-хозяина вектором и получения трансформированной клетки-хозяина. Способы и материалы для трансформации растительных клеток путем введения растительной конструкции в геном растения при осуществлении настоящего изобретения могут включать любой из хорошо известных и продемонстрированных способов. Подходящие способы включают среди прочих, но не ограничиваются ими, бактериальную инфекцию (например, *Agrobacterium*), бинарные ВАС-векторы, непосредственную доставку ДНК (например, посредством ПЭГ-опосредованной трансформации, опосредованного высыханием/ингибированием поглощения ДНК, электропорации, перемешивания с карбид-кремниевыми волокнами и ускорением покрытых ДНК частиц), редактирование генома (например, CRISPR-Cas-системы).

[0077] Клетки-хозяева могут представлять собой любую клетку или организм, как, например, растительную клетку, клетку водорослей, водоросли, клетки грибов, грибы, бактериальную клетку или клетку насекомых. В конкретных вариантах реализации указанные клетки-хозяева и трансформированные клетки могут включать клетки, полученные из сельскохозяйственных культур.

[0078] Транстенное растение впоследствии можно регенерировать из транстенной растительной клетки согласно настоящему изобретению. Используя традиционные методы селекции или самоопыления, можно получить семена из такого транстенного растения. Такое семя и полученное потомство, выращенное из таких семян, будет содержать рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению и, следовательно, будут транстенными.

[0079] Транстенные растения согласно настоящему изобретению

могут самоопыляться, обеспечивая семена для гомозиготных трансгенных растений согласно настоящему изобретению (гомозиготные по рекомбинантной молекуле ДНК), или могут скрещиваться с не являющимися трансгенными растениями или различными трансгенными растениями, обеспечивая семена для гетерозиготных трансгенных растений согласно настоящему изобретению (гетерозиготные по рекомбинантной молекуле ДНК). Оба таких гомозиготных и гетерозиготных трансгенных растения упоминаются в настоящем изобретении как «растения-потомки». Растения-потомки представляют собой трансгенные растения, происходящие от исходного трансгенного растения и содержащие рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению. Семена, полученные с применением трансгенного растения согласно настоящему изобретению, можно собирать и применять для выращивания поколений трансгенных растений, т.е. растений-потомков согласно настоящему изобретению, содержащих конструкцию согласно данному изобретению и экспрессирующих ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии. Описания способов селекции, которые обычно применяются для различных культур, можно найти в одном из нескольких справочников, см., 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) и *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

[0080] Трансформированные растения можно исследовать на наличие представляющего интерес гена или генов и уровня и/или профиля экспрессии, обеспечиваемого регуляторными элементами согласно настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники известны многочисленные способы, доступные для анализа трансформированных растений. Например, способы анализа растений

включают, но не ограничиваются ими, саузерн-блоты или нозерн-блоты, подходы на основе ПЦР, биохимические анализы, фенотипические способы скрининга, оценки полей и иммунодиагностические тесты. Экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК можно измерить с применением реагентов и способов TaqMan® (Applied Biosystems, Фостер Сити, штат Калифорния), описанных производителем, и при помощи времен ПЦР-цикла, определяемых с применением матрицы тестирования TaqMan®. В качестве альтернативы, для оценки экспрессии трансгена можно применять реагенты и способы Invader® (Third Wave Technologies, Мэдисон, штат Висконсинс) и способы, описанные производителем, .

[0081] Настоящее изобретение также обеспечивает части растения согласно настоящему изобретению. Части растений включают, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, клубни, семена, эндосперм, семязачаток и пыльцу. Части растений согласно настоящему изобретению могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми и/или нерегенерируемыми. Настоящее изобретение также включает и обеспечивает трансформированные растительные клетки, содержащие молекулу ДНК согласно настоящему изобретению. Указанные трансформированные или трансгенные растительные клетки согласно настоящему изобретению включают регенерируемые и/или нерегенерируемые растительные клетки.

[0082] В настоящем изобретении также предложен продукт потребления, который получают из трансгенного растения или его части, содержащей рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению. Товарные продукты согласно настоящему изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащей последовательность ДНК, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 1-15. В настоящем описании термин «продукт потребления» относится к любой композиции или продукту, который состоит из материала, полученного из трансгенного растения, семени, растительной клетки или части растения, содержащей рекомбинантную молекулу ДНК согласно настоящему изобретению. Товарные продукты включают, но не ограничиваются ими,

обработанные семена, зерна, части растений и шрот. Продукт потребления согласно настоящему изобретению будет содержать обнаруживаемое количество ДНК, соответствующее рекомбинантной молекуле ДНК согласно настоящему изобретению. Обнаружение по меньшей мере одной из таких ДНК в образце можно применять для определения содержимого продукта потребления или его источника. Можно применять любой стандартный способ обнаружения молекул ДНК, включая способы обнаружения, описанные в настоящем документе.

[0083] Изобретение будет более понятно за счет ссылки на следующие примеры, которые приведены в качестве примера и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное. Специалистам в данной области техники будет понятно, что методы, описанные в следующих примерах, представляют собой методы, раскрытые авторами настоящего изобретения для хорошего функционирования при осуществлении настоящего изобретения. Однако специалистам в данной области техники в свете настоящего описания будет понятно, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах реализации, описанных в настоящем документе, и по-прежнему могут быть получены аналогичные или сходные результаты без отступления от сущности и объема изобретения, поэтому всю информацию, изложенную или показанную на прилагаемых чертежах, следует интерпретировать как иллюстративную, а не как ограничивающую.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Идентификация и клонирование регуляторных элементов

[0084] Новые транскрипционные регуляторные элементы и группы регуляторных элементов экспрессии (EXP) были идентифицированы и клонированы из геномной ДНК двудольных растений видов *Cucumis melo* (WSH-39-1070AN) и *Medicago truncatula*.

[0085] Транскрипционные регуляторные элементы были выбраны на основе запатентованных и находящихся в публичном доступе данных микроматриц, полученных из экспериментов по определению профиля транскрипции, проведенных на соевых бобах (*Glycine max*)

и *Arabidopsis*, а также на основе поисков гомологии с применением известных последовательностей двудольных растений при запросе на поиск данных о запатентованных последовательностях *Cucumis melo* и запатентованных и находящихся в публичном доступе последовательностях *Medicago truncatula*.

[0086] Применяя идентифицированные последовательности, провели биоинформационный анализ для идентификации регуляторных элементов в амплифицированной ДНК. Например, биоинформационный анализ проводили для идентификации сайта начала транскрипции (TSS) и любой двунаправленной, интронной или расположенной выше кодирующей последовательности, присутствующей в указанной последовательности. Применяя результаты данного анализа, регуляторные элементы были определены в последовательностях ДНК и праймерах, разработанных для амплификации регуляторных элементов. Соответствующую молекулу ДНК для каждого регуляторного элемента амплифицировали с применением стандартных условий полимеразной цепной реакции с праймерами, содержащими уникальные сайты ферментов рестрикции и геномную ДНК, выделенными из *Cucumis melo* и *Medicago truncatula*. Полученные ДНК-фрагменты лигировали в базовые растительные векторы экспрессии с применением стандартных способов расщепления ферментом рестрикции совместимых сайтов рестрикции и лигирования ДНК.

[0087] Анализ регуляторного элемента TSS и интрон/экзонных границ сплайсинга можно осуществить с применением ткани трансформированного растения. Вкратце, указанные растения трансформируют растительными векторами экспрессии, содержащими фрагменты клонированной ДНК, функционально связанные с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Далее, 5'-RACE систему для быстрой амплификации кДНК-концов версии 2.0 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, 92008) применяют для подтверждения регуляторного элемента TSS и интрон/экзонных границ сплайсинга путем анализа последовательности ДНК полученных транскриптов мРНК.

[0088] Последовательности ДНК, кодирующие группы транскрипционных регуляторных элементов экспрессии *Cucumis* и

Medicago, или последовательности EXP, которые состоят из промоторного элемента, функционально связанного с лидерным элементом, представлены в Таблице 1 вместе с их соответствующими промоторами и лидерами.

Таблица 1. Группы транскрипционных регуляторных элементов экспрессии, промоторы, лидеры и интроны, выделенные из *Cucumis melo* и *Medicago truncatula*

Описание	SEQ ID №:	Аннотация гена
EXP-CUCme.Fe2:1	1	Предполагаемый белок ферредоксина 2 (Fe2)
P-CUCme.Fe2:1	2	Предполагаемый белок ферредоксина 2 (Fe2)
L-CUCme.Fe2:1	3	Предполагаемый белок ферредоксина 2 (Fe2)
EXP-CUCme.CipLhcb:1	4	Белок 13, связывающий хлорофилл a-b
P-CUCme.CipLhcb:1	5	Белок 13, связывающий хлорофилл a-b
L-CUCme.CipLhcb:1	6	Белок 13, связывающий хлорофилл a-b
EXP-CUCme.Bbz:1	7	Белок, подобный В-бох цинк-пальцевому белку 24
P-CUCme.Bbz:1	8	Белок, подобный В-бох цинк-пальцевому белку 24
L-CUCme.Bbz:1	9	Белок, подобный В-бох цинк-пальцевому белку 24
EXP-Mt.Lhcb2:1:1	10	Белок b2 светопоглощающего комплекса
P-Mt.Lhcb2-1:2:1	11	Белок b2 светопоглощающего комплекса
L-Mt.Lhcb2-1:2:1	12	Белок b2 светопоглощающего комплекса
EXP-Mt.PSII-T:1:1	13	Предшественник хлоропластов фотосистемы II
P-Mt.PSII-T-1:2:1	14	Предшественник хлоропластов

		фотосистемы II
L-Mt.PSII-T-1:2:1	15	Предшественник хлоропластов фотосистемы II

Пример 2

Анализ регуляторных элементов, опосредующих экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои

[0089] Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими исследуемый регуляторный элемент, опосредующий экспрессию трангена β -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на определение экспрессии белка GUS для оценки влияния выбранных регуляторных элементов на экспрессию.

[0090] Растения сои трансформировали растительными конструкциями экспрессии GUS, перечисленными в Таблице 2. Регуляторные элементы клонировали в базовый растительный вектор экспрессии, применяя стандартные способы, известные в данной области техники. Полученные растительные векторы экспрессии содержали область правой границы от *Agrobacterium tumefaciens* (граница B-AGRtu.right), первую трансгенную селекционную кассету, применяемую для отбора трансформированных растительных клеток, которая обуславливает устойчивость либо к гербициду глифосату, либо к антибиотику спектиномицину; вторую трансгенную кассету для оценки активности регуляторного элемента, который содержит последовательность EXP, функционально связанную с 5'-концом кодирующей последовательности β -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID №: 17), содержащую процессируемый интрон, полученный из тканеспецифичного гена ST-LS1, индуцируемого светом (Genbank Accession: X04753), функционально связанного 5'-концом с 3'-концевой областью гена E6 *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID №: 18); и область левой границы от *Agrobacterium tumefaciens* (граница B-AGRtu.left).

Таблица 2. Регуляторные элементы и соответствующие плазмидные конструкции экспрессии GUS

Конструкция	Описание EXP	SEQ ID №:
pMON142244	EXP-CUCme.Fe2:1	1

pMON142241	EXP-CUCme.CipLhcb:1	4
pMON142216	EXP-CUCme.Bbz:1	7
pMON116798	EXP-Mt.Lhcb2:1:1	10
pMON116792	EXP-Mt.PSII-T:1:1	13

[0091] Растительные клетки сои трансформировали с применением бинарных трансформационных векторов конструкций, описанных выше, путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, с применением способов, известных в данной области техники. Полученные трансформированные растительные клетки индуцировали с образование целых растений сои.

[0092] Гистохимический анализ GUS применяли для качественного и количественного анализа экспрессии трансформированных растений. Целые участки ткани инкубировали с окрашивающим GUS раствором X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуронид) (1 миллиграмм/миллилитр) в течение соответствующего отрезка времени, промывали и визуальное проверяли на наличие синей окраски. Активность GUS качественно определяли путем непосредственного визуального осмотра или осмотра под микроскопом с применением выбранных органов и тканей растений.

[0093] Для количественного анализа экспрессии GUS общий белок экстрагировали из выбранных тканей трансформированных растений сои. Один микрограмм общего белка применяли с флюорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкуронидом (MUG) в общем объеме реакции 50 мкл. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4-MU), проявлял максимальный уровень флуоресценции при высоком pH, когда была ионизирована гидроксильная группа. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует pH для количественного определения флуоресцентного продукта. Флуоресценцию измеряли с помощью возбуждения при 365 нм, излучении при 445 нм, применяя Fluoromax-3 с ридером Micromax, с шириной щели, установленной при возбуждении 2 нм и при эмиссии 3 нм. Значения представлены в единицах нмоль GUS/час/мг общего белка.

[0094] Следующие образцы ткани были отобраны для

определения экспрессии GUS в поколении R₀; на стадии Vn5 в листе с ложбинкой (sink leaf), исходном листе и корне; на стадии R1 в черешке, исходном листе, цветке и семядоле; на стадии R3 в бобе и незрелых семенах; и на стадии желтого боба в зародыше и семядоле. Ниже в Таблицах 3 и 4 показаны средние значения количественной экспрессии GUS для каждого из отобранного образца тканей, опосредованной регуляторными элементами, представленными в Таблице 2.

Таблица 3. Средние значения количественной экспрессии GUS в стабильно трансформированных растениях сои, опосредованной регуляторными элементами, полученными из *Cucumis melo*

Стадия	Орган	EXP- CUCme.Fe2:1	EXP- CUCme.CipLhcb:1	EXP- CUCme.Bbz:1
Vn5	Лист с ложбинкой	391	159	100
Vn5	Корень	40	35	24
Vn5	Исходный лист	431	120	185
R1	Черешок	581	724	32
R1	Исходный лист	600	357	41
R1	Цветок	290	111	30
R5	Семядоль	38	31	13
R3	Боб	778	1199	85
R3	Незрелое семя	52	56	47
Желтый боб	Зародыш	23	28	38
Желтый боб	Семядоль	33	35	49

Таблица 4. Средние значения количественной экспрессии GUS в стабильно трансформированных растениях сои, опосредованной регуляторными элементами, полученными из *Medicago truncatula*

Стадия	Орган	EXP-Mt.Lhcb2:1:1	EXP-Mt.PSII-T:1:1
Vn5	Лист с ложбинкой	108	22
Vn5	Корень	21	11
Vn5	Исходный лист	148	42
R1	Черешок	153	83
R1	Исходный лист	94	118
R1	Цветок	39	21
R5	Семядоль	13	9
R3	Боб	85	33
R3	Незрелое семя	5	9
Желтый боб	Зародыш	4	0
Желтый боб	Семядоль	4	0

[0095] Как видно из Таблиц 3 и 4, каждый из регуляторных элементов обладает уникальным профилем экспрессии в отобранных образцах тканей. Как EXP-CUCme.Fe2:1 (SEQ ID №: 1), так и EXP-CUCme.CipLhcb:1 (SEQ ID №: 4) экспрессируются на высоком уровне на стадии R3 в бобе и показывают самый низкий уровень экспрессии на стадии R3 в незрелом семени, на стадии Vn5 в корне, на стадии R5 в семядоли и на стадии желтого боба в зародыше и семядоли. Экспрессия GUS, опосредованная EXP-CUCme.Fe2:1, также была высокой на стадии Vn5 в листе с ложбинкой и исходном листе и на стадии R1 в черешке, исходном листе и цветке. Регуляторный элемент EXP-CUCme.Bbz:1 (SEQ ID №: 7) продемонстрировал наивысший уровень экспрессии на стадии Vn5 в листе с ложбинкой и исходном листе, а также на стадии R3 в бобе. Экспрессия GUS, опосредованная EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID №: 10), была самой высокой на стадии Vn5 в исходном листе и на стадии R1 в черешке. EXP-Mt.PSII-T:1:1 (SEQ ID №: 13) продемонстрировал наивысший уровень экспрессии на стадии R1 в исходном листе.

[0096] Каждый регуляторный элемент обеспечивает уникальный профиль экспрессии, который можно применять для оптимального опосредования экспрессии различных трансгенов в зависимости от предпочтительной экспрессии в требуемых тканях.

Пример 3**Энхансерные элементы, полученные из регуляторных элементов**

[0097] Энхансеры получают из промоторных элементов, представленных в виде SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14. Энхансерный элемент может состоять по меньшей мере из одного цис-регуляторного элемента, которые при функциональном связывании с 5'- или 3'-концом промоторного элемента или при функциональном связывании с 5'- или 3'-концом дополнительных энхансерных элементов, которые функционально связаны с промотором, могут улучшать или модулировать уровни экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК или обеспечивать экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК в определенном типе клеток или органе растения, или в определенный момент времени развития или циркадианного ритма. Энхансеры получают путем удаления ТАТА-бокса или функционально схожих элементов и любой расположенной ниже последовательности из промоторов, которые способствуют инициации транскрипции с промоторной последовательности, например, последовательности, представленной в виде SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14 или их фрагментов.

[0098] ТАТА-бокс в промоторах растений не является настолько высоко консервативным, как в некоторых других эукариотических организмах. Поэтому для определения фрагмента в качестве энхансера для начала необходимо идентифицировать сайт начала транскрипции (TSS) гена, при этом сначала транскрибируется 5'-НТО. Например, транскрипционный регуляторный элемент, EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID №: 10) состоит из промоторного элемента, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 11), функционально связанного с 5'-НТО, или лидерного элемента, L-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 12). В промоторном элементе 1837 bp P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 11) предполагаемый основной ТАТА-подобный элемент обнаруживается в нуклеотидах с 1798 по 1803. Энхансерный фрагмент, полученный из P-Mt.Lhcb2-1:2:1, может содержать нуклеотиды с 1 по 1797 последовательности SEQ ID №: 11, что в результате приводит к последовательности, представленной в виде SEQ ID №: 16 (E-Mt.Lhcb2). Энхансеры, полученные из промотора, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 11), могут дополнительно содержать

более мелкие фрагменты E-Mt.Lhcb2 (SEQ ID №: 16). Эффективность энхансерных элементов, полученных из промотора P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 11), определяют эмпирически путем создания химерного транскрипционного регуляторного элемента, содержащего энхансер, полученный из промотора, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID №: 11), который функционально связан с промотором и лидером и который применяют для опосредования экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК, такой как GUS, в анализах на определение стабильной или транзientой экспрессии у растений.

[0099] Может потребоваться дальнейшее усовершенствование энхансерного элемента, и это подтверждают эмпирически. Кроме того, положение энхансерного элемента относительно других элементов в химерном транскрипционном регуляторном элементе также определяют эмпирически, поскольку порядок каждого элемента в химерном транскрипционном регуляторном элементе может оказывать различное влияние в зависимости от относительного положения каждого элемента. Некоторые промоторные элементы будут содержать множество TATA-боксов или подобных TATA-боксу элементов и, возможно, множество сайтов начала транскрипции. В этих обстоятельствах сначала может потребоваться идентификация местоположения первого TSS, а затем начало разработки энхансеров с применением первого TSS для предотвращения возможной инициации транскрипции в предполагаемом энхансерном элементе.

[00100] Энхансерные элементы, полученные из промоторных элементов, представленных в виде SEQ ID №: 2, 5, 8, 11 и 14, клонируют с применением способов, известных в данной области техники, для функционального связывания с 5'-или 3'-концом промоторного элемента или функционального связывания с 5'- или 3'-концом дополнительных энхансерных элементов, которые функционально связаны с промотором. В качестве альтернативы, энхансерные элементы можно клонировать с применением способов, известных в данной области техники, для обеспечения большего по размеру энхансерного элемента, который состоит из двух или более копий энхансера, и клонировать с применением способов, известных в данной области техники, для функционального связывания с 5'-или 3'-концом промоторного элемента или функционального

связывания с 5'- или 3'-концом дополнительных энхансерных элементов, которые функционально связаны с промотором, что приводит к получению химерного транскрипционного регуляторного элемента. Энхансерные элементы также можно клонировать с применением способов, известных в данной области техники, для функционального связывания с 5'-концом промоторного элемента, полученного из организма другого рода, или для функционального связывания с 5'- или 3'-концом дополнительных энхансерных элементов, полученных из организмов другого рода, которые функционально связаны с промотором, полученным либо из организма одного или того же рода, либо организма другого рода, что приводит к получению химерного транскрипционного регуляторного элемента. Растительный трансформационный вектор экспрессии GUS можно сконструировать с применением способов, известных в данной области техники, аналогично конструкциям, описанным выше в Примере 2, в котором полученные растительные векторы экспрессии содержат область правой границы от *Agrobacterium tumefaciens* (граница B-AGRtu.right), первую трансгенную селекционную кассету, применяемую для отбора трансформированных растительных клеток, которая обуславливает устойчивость к антибиотику, спектиномицину; и вторую трансгенную кассету для исследования энхансерного элемента, состоящего из энхансерного элемента, функционально связанного с 5'- или 3'-концом промоторного элемента или функционально связанного с 5'- или 3'-концом дополнительных энхансерных элементов, которые, в свою очередь, функционально связаны с промотором, который функционально связан с 5'-концом лидерного элемента, функционально связанного с кодирующей последовательностью для β -глюкуронидазы (GUS, GOI-Eс.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID №: 17), содержащей процессируемый интрон, полученный из тканеспецифичного гена картофеля ST-LS1, индуцируемого светом (Genbank Accession: X04753), функционально связанный с 3'-концевой областью гена E6 *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID №: 18), и область левой границы от *A. tumefaciens* (граница B-AGRtu.left). Полученные плазмиды применяют для трансформации растений сои или других родов

растений способами, описанными выше. В качестве альтернативы, протопластические клетки, полученные из растения сои или других родов растений, трансформируют с применением способов, известных в данной области техники, для проведения транзиентных анализов.

[00101] Экспрессия GUS, опосредованная регуляторным элементом, содержащим по меньшей мере один энхансер, оценивают в анализах на определение стабильной или транзиентной экспрессии у растений для определения влияния указанного энхансерного элемента на экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК. Модификации по меньшей мере одного энхансерного элемента или дупликации по меньшей мере одного энхансерного элемента можно осуществить на основе эмпирического эксперимента и регуляции полученной в результате экспрессии генов, которая наблюдается при применении каждой композиции регуляторных элементов. Изменение относительного положения по меньшей мере одного энхансера в полученных регуляторных или химерных регуляторных элементах может влиять на транскрипционную активность или специфичность регуляторного или химерного регуляторного элемента, и его определяют эмпирически для определения наилучших энхансеров для требуемого профиля экспрессии трансгена в растении кукурузе или растении другого рода.

На основании иллюстрации и описания принципов настоящего изобретения специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение можно модифицировать в варианте реализации и деталях без отступления от таких принципов. В настоящей заявке заявлены все модификации, которые соответствуют сущности и входят в объем формулы изобретения. Все публикации и опубликованные патентные документы, которые процитированы в настоящем документе, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была бы напрямую или косвенно указана для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула ДНК, обладающая промоторной активностью в растении или его части, содержащая последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-3;

б) последовательности содержащей любую из SEQ ID NO: 1-3; и

с) фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-3, где фрагмент обладает регулирующей гены активностью;

где указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.

2. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что указанная последовательность обладает по меньшей мере 90-процентной идентичностью последовательности с последовательностью ДНК любой из SEQ ID NO: 1-3.

3. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 2, отличающаяся тем, что указанная последовательность обладает по меньшей мере 95-процентной идентичностью последовательности с последовательностью ДНК любой из SEQ ID NO: 1-3.

4. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 3, отличающаяся тем, что указанная последовательность содержит последовательность ДНК любой из SEQ ID NO: 1-3.

5. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность ДНК обладает регулирующей гены активностью.

6. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что гетерологичная транскрибируемая молекула ДНК содержит ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии.

7. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 6, отличающаяся тем, что ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии, обуславливает невосприимчивость растений к гербицидам.

8. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 6, отличающаяся тем, что ген, представляющий интерес с точки зрения агрономии, обуславливает устойчивость растений к вредителям.

9. Трансгенная растительная клетка, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую последовательность,

выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-3;

б) последовательности содержащей любую из SEQ ID NO: 1-3; и

с) фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-3, где фрагмент обладает регулирующей гены активностью;

где указанная последовательность функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.

10. Трансгенная растительная клетка по п. 9, отличающаяся тем, что указанная трансгенная растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения.

11. Трансгенная растительная клетка по п. 9, отличающаяся тем, что указанная трансгенная растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения.

12. Трансгенное растение или его часть, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п.1.

13. Растение-потомок трансгенного растения по п. 12 или его часть, где указанное растение-потомок или его часть содержат указанную рекомбинантную молекулу.

14. Трансгенное семя, где указанное семя содержит рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1.

15. Способ получения продукта потребления, включающий получение трансгенного растения или его части по п. 12 и получение из него продукта потребления.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный продукт потребления представляет собой белковый концентрат, белковый изолят, зерно, крахмал, семена, шрот, муку, биомассу или масло семян.

17. Способ экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК, включающий получение трансгенного растения по п. 12 и культивирование растения с экспрессией транскрибируемой ДНК.

По доверенности

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202192904

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 15/82, 15/02, 5/04, 15/63, A01H 1/06, 5/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	GENBANK: LN713260.1. Cucumis melo genomic chromosome, chr_6, 05.03.2015, последовательность	1-17
Y	RU 2568056 C2 (ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЭЛЭЛСИ и др.) 10.11.2015, формула, реферат, примеры 1-15, абзацы 2-7	1-17
Y	WO 2009/095881 A2 (NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCES) 06.08.2009, формула, реферат, примеры 1-28	1-17

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

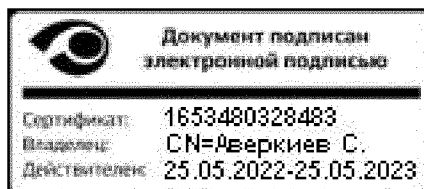
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 17 июня 2022 (17.06.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202192904

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)