

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202193030 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.08.31

(22) Дата подачи заявки  
2018.01.18

(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 ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

---

(31) 62/448,019

(32) 2017.01.19

(33) US

(62) 201991714; 2018.01.18

(71) Заявитель:  
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС  
(US)

(72) Изобретатель:  
Дейвис Иан В., Шарифф Аабид (US)

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

(57) В изобретении предложены молекулы и конструкции рекомбинантных ДНК, а также их нуклеотидные последовательности, применимые для модуляции экспрессии генов в растениях. В изобретении также предложены трансгенные растения, клетки растений, части растений и семена, содержащие молекулы рекомбинантной ДНК, функционально связанные с гетерологичными транскрибируемыми молекулами ДНК, а также способы их использования.

A1

202193030

202193030

A1

**РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ****ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

**[0001]** В настоящей заявке испрашивается преимущество по предварительной заявке США № 62/448,019, поданной 19 января 2017 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

**[0002]** Машиночитаемая форма списка последовательностей, который содержится в файле с именем «MONS436WO-sequence\_listing.txt», имеет размер 59 917 байт (согласно измерениям в Microsoft Windows®), была создана 12 января 2018 года и подается в электронной форме одновременно с данной заявкой, а также включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

**[0003]** Изобретение относится к области молекулярной биологии растений и геной инженерии растений. Более конкретно, изобретение относится к молекулам ДНК, которые могут использоваться для модуляции экспрессии генов в растениях.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0004]** Регуляторные элементы – это 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 могут быть применимы в области молекулярной биологии растений и геной инженерии растений.

**КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0005]** Изобретение обеспечивает новые синтетические генные регуляторные элементы для использования в растениях. Изобретение также относится к рекомбинантным молекулам и конструкциям ДНК, содержащим регуляторные элементы. Настоящее изобретение также относится к трансгенным растительным клеткам, растениям и семенам, содержащим синтетические регуляторные элементы. В одном варианте осуществления синтетические регуляторные элементы

функционально связаны с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Настоящее изобретение также обеспечивает способы использования синтетических регуляторных элементов и способы получения и использования рекомбинантных молекул ДНК, содержащих синтетические регуляторные элементы и трансгенных растительных клеток, растений и семян, содержащих синтетические регуляторные элементы, функционально связанные с транскрибируемой молекулой ДНК.

[0006] Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (a) последовательности, по меньшей мере на 85 процентов идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO:1-29 и 43-45; (b) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO:1-29 и 43-45 и (c) фрагмента любой из SEQ ID NO:1-29 и 43-45, причем этот фрагмент обладает генорегуляторной активностью; при этом 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 осуществления молекула рекомбинантной ДНК содержит последовательность ДНК, которая по меньшей мере приблизительно на 90 процентов, по меньшей мере на 91 процент, по меньшей мере на 92 процента, по меньшей мере на 93 процента, по меньшей мере на 94 процента, по меньшей мере на 95 процентов, по меньшей мере на 96 процентов, по меньшей мере на 97 процентов, по меньшей мере на 98 процентов или по меньшей мере на 99 процентов идентична любой из последовательности ДНК SEQ ID NO:1-29 и 43-45. В конкретных вариантах осуществления последовательность ДНК содержит регуляторный элемент. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент содержит промотор. В еще других вариантах осуществления гетерологичная транскрибируемая молекула ДНК содержит ген, представляющий агрономический интерес, такой как ген, способный обеспечивать устойчивость к гербицидам у

растений, или ген, способный обеспечивать устойчивость растений к вредителям растений. В еще других вариантах осуществления изобретение относится к конструкции, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с представленным в настоящем документе.

**[0007]** В другом аспекте в настоящем документе представлены трансгенные растительные клетки, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (a) последовательности, по меньшей мере на приблизительно 85 процентов идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO:1-29 и 43-45; (b) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO:1-29 и 43-45 и (c) фрагмента любой из SEQ ID NO:1-29 и 43-45, причем этот фрагмент обладает генорегуляторной активностью; при этом последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. В определенных вариантах осуществления трансгенная растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения. В других вариантах осуществления трансгенная растительная клетка представляет собой клетку двудольного растения.

**[0008]** В еще одном другом аспекте в настоящем документе дополнительно представлено трансгенное растение или его часть, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, включающую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: а) последовательности, по меньшей мере на 85 процентов идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO:1-29 и 43-45; б) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO:1-29 и 43-45, и с) фрагмента любой из SEQ ID NO:1-29 и 43-45, причем этот фрагмент обладает генорегуляторной активностью; при этом последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. В конкретных вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой растение-потомок любого поколения, которое содержит молекулу рекомбинантной ДНК. В данном документе также представлено трансгенное семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, из которого при проращивании вырастает такое трансгенное растение.

**[0009]** В другом аспекте изобретение относится к способу получения товарного продукта, содержащему получение трансгенного растения или его части, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением, и получение из него товарного продукта. В одном варианте осуществления товарный продукт представляет собой обработанные семена, зерна, части растений, растительные масла и крупу.

**[0010]** В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения трансгенного растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением, включающему трансформацию клетки растения с помощью молекулы рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением для получения трансформированной клетки растения и регенерацию трансгенного растения из трансформированной растительной клетки.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0011]** SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность ДНК группы синтетических регуляторных элементов экспрессии (EXP), EXP-At.GSP442.nno+At.Сусо:3, содержащей синтетический промотор (P-At.GSP442.nno:2), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP442.nno:1), функционально связанным 5' с интроном (I-At.Сусо:2).

**[0012]** SEQ ID NO:2 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP442.nno:2.

**[0013]** SEQ ID NO:3 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP442.nno:1.

**[0014]** SEQ ID NO:4 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP571, содержащего синтетический промотор (P-At.GSP571.nno:5), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP571. no: 1).

**[0015]** SEQ ID NO:5 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP571.nno:5.

**[0016]** SEQ ID NO:6 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP571.nno:1.

**[0017]** SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность ДНК группы синтетических регуляторных элементов экспрессии (EXP), EXP-At.GSP571.nno+At.Сусо:2, содержащей синтетический

промотор (P-At.GSP571.nno:5), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP571.nno:1), функционально связанным 5' с интроном (I-At.Сусо:2).

[0018] SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность ДНК группы синтетических регуляторных элементов экспрессии (EXP), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10, содержащей синтетический промотор (P-At.GSP571.nno:5), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP571.nno:1), функционально связанным 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI21.nno:2).

[0019] SEQ ID NO:9 представляет собой синтетическую интронную последовательность, I-At.GSI21.nno:2.

[0020] SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP571.nno:5), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP571.nno:1), функционально связанным 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI102.nno:1).

[0021] SEQ ID NO:11 представляет собой синтетическую интронную последовательность, I-At.GSI102.nno:1.

[0022] SEQ ID NO:12 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP564, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP564.nno:3), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP564). no: 1).

[0023] SEQ ID NO:13 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP564.nno:3.

[0024] SEQ ID NO:14 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP564.nno:1.

[0025] SEQ ID NO:15 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.Сусо:2, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP564.nno:3), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP564.nno:1), оперативно связанным 5' с интроном (I-At.Сусо:2).

[0026] SEQ ID NO:16 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP564.nno:3),

функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP564.nno:1), функционально связанным 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI17.nno:1).

**[0027]** SEQ ID NO:17 представляет собой синтетическую интронную последовательность, I-At.GSI17.nno:1.

**[0028]** SEQ ID NO:18 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP564.nno:3), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP564.nno:1), функционально связанным 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI102.nno:1).

**[0029]** SEQ ID NO:19 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP579, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP579.nno:2), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP579. no: 1).

**[0030]** SEQ ID NO:20 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP579.nno:2.

**[0031]** SEQ ID NO:21 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP579.nno:1.

**[0032]** SEQ ID NO:22 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP579.nno:2), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP579.nno:1), функционально связанный 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI102.nno:1).

**[0033]** SEQ ID NO:23 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1, содержащую синтетический химерный промотор (P-At.GSP571/442, который состоит из синтетического энхансера (E-At.GSP571.nno:1), функционально связанного 5' с синтетическим промотором (P-At.GSP442.nno:2)), функционально связанным 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP442.nno:1), функционально связанным 5' с лидером (L-At.Сусо-1:1:2), функционально связанным 5' с интроном (I-At.Сусо:2).

**[0034]** SEQ ID NO:24 является синтетической энхансерной

последовательностью, E-At.GSP571.nno:1.

[0035] SEQ ID NO:25 представляет собой последовательность ДНК синтетического химерного промотора P-At.GSP571/442, состоящего из синтетического энхансера (E-At.GSP571.nno:1), функционально связанного 5' с синтетическим промотором (P-At.GSP442.nno:2).

[0036] SEQ ID NO:26 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP576.nno:4), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP576.nno:2), функционально связанным 5' с синтетическим интроном (I-At.GSI17.nno:1).

[0037] SEQ ID NO:27 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP576.nno:4.

[0038] SEQ ID NO:28 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP576.nno:2.

[0039] SEQ ID NO:29 представляет собой синтетическую 3'-нетранслируемую область, T-Zm.GST59.nno:1.

[0040] SEQ ID NO:30 представляет собой последовательность ДНК синтетической EXP, EXP-At.GSP221+At.Сусо:3, содержащую синтетический промотор (P-At.GSP221:3), функционально связанный 5' с синтетическим лидером (L-At.GSP221:1), функционально связанным 5' с интроном (I-At.Сусо:2).

[0041] SEQ ID NO:31 представляет собой синтетическую промоторную последовательность, P-At.GSP221:3.

[0042] SEQ ID NO:32 представляет собой синтетическую лидерную последовательность, L-At.GSP221:1.

[0043] SEQ ID NO:33 является интронной последовательностью I-At.Сусо:2, полученной из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis*.

[0044] SEQ ID NO:34 представляет собой последовательность 3'-нетранслируемой области, T-Mt.Sali3-2-1:2:1, полученную из гена *Sali3 Medicago truncatula*.

[0045] SEQ ID NO:35 представляет собой последовательность 3'-нетранслируемой области, T-Mt.Oxr-1:2:1, полученную из предполагаемого гена белка оксидоредуктазы (OXR) из *Medicago*



*truncatula*.

[0046] SEQ ID NO:36 представляет собой последовательность 3'-нетранслируемой области, T-Gb.FbL2:1, полученную из гена FbLate-2 *Gossypium barbadense*.

[0047] SEQ ID NO:37 представляет собой последовательность 3'-нетранслируемой области, T-Mt.RD22-1:2:1, полученную из чувствительного к дегидратации гена белка RD22 *Medicago truncatula*.

[0048] SEQ ID NO:38 представляет собой последовательность ДНК EXP, полученную из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis*, EXP-At.Сусо:1:1, содержащего промотор (P-At.Сусо-1:1:2), функционально связанный 5' с лидером (L-At.Сусо-1:1:2), функционально связанным 5' с интроном (I-At.Сусо-1:1:1).

[0049] SEQ ID NO:39 представляет собой промоторную последовательность P-At.Сусо-1:1:2, полученную из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis*.

[0050] SEQ ID NO:40 является лидерной последовательностью L-At.Сусо-1:1:2, полученной из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis*.

[0051] SEQ ID NO:41 представляет собой интронную последовательность I-At.Сусо-1:1:1, полученную из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis*.

[0052] SEQ ID NO:42 представляет собой кодирующую последовательность для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) с модифицируемым интроном, полученным из светоиндуцируемого тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753).

[0053] SEQ ID NO:43 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-At.GSP442+LI-At.Сусо, содержащую синтетический промотор, P-At.GSP442.nno:2, функционально связанный 5' с синтетическим лидером, L- At.GSP442.nno:1, функционально связанным 5' с лидером, L-At.Сусо-1:1:2, функционально связанным 5' с интроном, I-At.Сусо:2.

[0054] SEQ ID NO:44 представляет собой последовательность ДНК синтетической 3'-нетранслируемой области, T-Zm.GST7.nno:2.

[0055] SEQ ID NO:45 представляет собой последовательность

ДНК EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1, содержащую синтетический промотор, P-At.GSP564.nno:3, функционально связанный 5' с синтетическим лидером, L-At.GSP564.nno:1, который функционально связан 5' с интроном, I-At.Сусо:2.

[0056] SEQ ID NO:46 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-CaMV.35S, включающую промотор 35S и лидер, полученный из вируса мозаики цветной капусты.

[0057] SEQ ID NO:47 представляет собой последовательность ДНК интрона I-Zm.DnaK: 1, полученную из гена белка теплового шока 70 (Hsp70) (DnaK) из *Zea mays*.

[0058] SEQ ID NO:48 представляет собой последовательность ДНК 3'-нетранслируемой области, T-Os.LTP: 1, полученную из гена белка, подобного белку переноса липидов (LTP), из *Oryza sativa*.

[0059] SEQ ID NO:49 является кодирующей последовательностью для флуоресцентного белка люциферазы NanoLuc<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI 53711), Nluc, который был создан путем направленной эволюции из люциферазы глубоководных креветок (*Oplophorus gacilirostris*).

[0060] SEQ ID NO:50 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-At.Bglu21+At.Сусо:2, содержащую промотор и лидер гена бета-глюкуронидазы 21 из *Arabidopsis thaliana*, функционально связанные 5' с интроном, I- At.Сусо-1:1:1.

[0061] SEQ ID NO:51 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-CaMV.35S-Enh+Ph.DnaK:1:3, содержащую промотор 35S усиленного вируса мозаики цветной капусты, функционально связанный 5' с геном лидера белка теплового шока 70 (HSP70) ген из гибридов петуний.

[0062] SEQ ID NO:52 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1, содержащую промотор и лидер первичного гена 7S альфа сои.

[0063] SEQ ID NO:53 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-CaMV.35S-Enh+Zm.DnaK:1:1, содержащую промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, функционально связанный 5' с интроном, I-Zm.DnaK: 1.

[0064] SEQ ID NO:54 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую белок люциферазы (LUCIFERASE 1:3), полученный из

*Photinus pyralis* (светлячок).

[0065] SEQ ID NO:55 представляет собой последовательность ДНК 3'-нетранслируемой области, T-AGRtu.nos-1:1:13, полученную из гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*.

[0066] SEQ ID NO:56 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-CaMV.35S-Enh-Lhcb1, содержащую усиленный промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, функционально связанный 5' с лидером связывающего хлорофилл a/b гена светособирающего комплекса *Triticum aestivum* (пшеница).

[0067] SEQ ID NO:57 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую белок люциферазы (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1), полученный из *Renilla reniformis*.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0068] Изобретение обеспечивает синтетические регуляторные элементы, обладающие генорегуляторной активностью в растениях. Нуклеотидные последовательности этих синтетических регуляторных элементов представлены в виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45. Такие синтетические регуляторные элементы способны влиять на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК в тканях растений и, следовательно, регулировать экспрессию генов функционально связанного трансгена в трансгенных растениях. Изобретение также предлагает способы модификации, выработки и использования молекул рекомбинантной ДНК, которые содержат предоставленные синтетические регуляторные элементы. Изобретение также обеспечивает композиции, которые включают трансгенные растительные клетки, растения, части растений и семена, содержащие молекулы рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением, и способы их получения и использования.

[0069] Последующие объяснения терминов и способов представлены для лучшего описания настоящих соединений, композиций и способов, и для инструктирования специалистов в данной области при осуществлении настоящего описания на практике. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии со стандартным использованием специалистами в соответствующей области техники.

Молекулы ДНК

**[0070]** Используемый в данном документе термин «ДНК» или «молекула ДНК» относится к двухцепочечной молекуле ДНК геномного или синтетического происхождения, то есть, к полимеру дезоксирибонуклеотидных оснований или молекуле ДНК, считываемой с 5' конца (против хода транскрипции) до 3' конца (по ходу транскрипции). Используемый в данном документе термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Используемая в данном документе номенклатура соответствует номенклатуре раздела 37 Кодекса федеральных правил США, 1.822, и приведена в таблицах в стандарте WIPO ST.25 (1998), приложение 2, таблицы 1 и 3.

**[0071]** Используемый в данном документе термин «молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не могли бы возникнуть в природе в такой комбинации без вмешательства человека. Например, молекула рекомбинантной ДНК может представлять собой молекулу ДНК, которая состоит по меньшей мере из двух молекул ДНК, гетерологичных по отношению друг к другу, молекулу ДНК, которая содержит последовательность ДНК отличающуюся от последовательностей ДНК, существующих в природе, молекулу ДНК, которая содержит синтетическую последовательность ДНК или молекулу ДНК, которая была включена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генов.

**[0072]** В контексте данного документа термин «синтетическая нуклеотидная последовательность» или «синтетическая полинуклеотидная последовательность» представляет нуклеотидную последовательность, о которой нет данных о том, что она встречается в природе, которая не встречается в природе или которая не происходит без вмешательства человека. Генно-регуляторные элементы по настоящему изобретению включают синтетические нуклеотидные последовательности. Предпочтительно, синтетические нуклеотидные последовательности имеют малую или не имеют расширенной гомологии с природными последовательностями. Расширенная гомология в данном контексте обычно относится к 100% идентичности последовательности, простирающейся за пределы примерно 25 нуклеотидов непрерывной последовательности.

[0073] Ссылка в настоящей заявке на «выделенную молекулу ДНК» или эквивалентный термин или фразу предназначена для обозначения того, что молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не в ее естественной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и тому подобные, которые естественным образом обнаруживаются в ДНК генома организма, не считаются «выделенными» до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том месте внутри генома, в котором он находится естественным образом. Однако каждый из этих элементов и их частей будет «выделен» в рамках данного раскрытия, если этот элемент находится вне генома организма и положения внутри генома, в котором он находится естественным образом. В одном варианте осуществления термин «выделенный» относится к молекуле ДНК, которая, по меньшей мере частично отделена от некоторых нуклеиновых кислот, которые обычно фланкируют молекулу ДНК в ее нативном или естественном состоянии. Таким образом, молекулы ДНК, конденсированные с регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не связаны, например, в результате рекомбинантных технологий, в данном документе считаются выделенными. Такие молекулы считаются выделенными в случае, когда они интегрированы в хромосому клетки-хозяина или присутствуют в растворе нуклеиновой кислоты с другими молекулами ДНК, поскольку они не находятся в своем естественном состоянии. Для целей настоящего раскрытия любая трансгенная нуклеотидная последовательность, то есть, нуклеотидная последовательность ДНК, вставленная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, должна рассматриваться как выделенная нуклеотидная последовательность вне зависимости от того, присутствует она в плазмиде или подобной структуре, используемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии, или присутствует в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве,

биологических образцах или товарных продуктах, полученных из растения или бактерии.

**[0074]** Используемый в данном документе термин «идентичность последовательности» относится к степени, в которой две оптимально выровненные полинуклеотидные последовательности или две оптимально выровненные полипептидные последовательности являются идентичными. Оптимальное выравнивание последовательности создается путем ручного выравнивания двух последовательностей, *например*, эталонной последовательности и другой последовательности, таким образом, чтобы максимизировать количество совпадений нуклеотидов в выравнивании последовательностей с соответствующими внутренними вставками, делециями или брешами нуклеотидов. Используемый в данном документе термин «эталонная последовательность» относится к последовательности ДНК, представленной в виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45.

**[0075]** Используемый в данном документе термин «процентная идентичность последовательности» или «процентная идентичность» или «% идентичности» – это доля идентичности, умноженная на 100. «Доля идентичности» для последовательности, оптимально выровненной с эталонной последовательностью, представляет собой число совпадений нуклеотидов в оптимальном выравнивании, разделенное на общее количество нуклеотидов в эталонной последовательности, *например*, общее количество нуклеотидов в полной длине всей эталонной последовательности. Таким образом, один вариант осуществления изобретения относится к молекуле ДНК, содержащей последовательность, которая при оптимальном выравнивании с эталонной последовательностью, представленной в настоящем документе как любая из SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, которая идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 85 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 86 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 87 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 88 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 89 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей

мере на 90 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 91 процент, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 92 процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 93 процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 94 процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 95 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 96 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 97 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 98 процентов, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 99 процентов или идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 100 процентов. В еще других конкретных вариантах осуществления последовательность, имеющая процентную идентичность с любой из SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, может быть определена как проявляющая активность промотора, которой обладает исходная последовательность, из которой она получена. Последовательность, имеющая процентную идентичность любой из SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, может дополнительно содержать «минимальный промотор», который обеспечивает базовый уровень транскрипции и состоит из блока ТАТА или эквивалентной последовательности для распознавания и связывания комплекса РНК-полимеразы II для инициации транскрипции.

#### **Регуляторные элементы**

[0076] Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидеры (также известные как 5'-нетранслируемые области), энхансеры, интроны и области терминации транскрипции (или 3'-нетранслируемые области), играют неотъемлемую роль в общей экспрессии генов в живых клетках. Используемый в данном документе термин «регуляторный элемент» относится к молекуле ДНК, обладающей генно-регуляторной активностью. Термин «регуляторная активность генов», используемый в данном документе, относится к способности влиять на экспрессию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК, например, путем воздействия на транскрипцию и/или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы

ДНК. Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидеры, энхансеры, интроны и 3'-нетранслируемые области, которые функционируют в растениях, применимы для модификации фенотипов растений посредством генной инженерии.

[0077] Используемый в данном документе термин «группа регуляторных элементов экспрессии» или «EXR» может относиться к группе функционально связанных регуляторных элементов, таких как энхансеры, промоторы, лидеры и интроны. Например, группа регуляторных элементов экспрессии может состоять, например, из промотора, функционально связанного с лидерной последовательностью. EXR, применяемая для реализации на практике настоящего изобретения, включает SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 и 45.

[0078] Регуляторные элементы могут характеризоваться присущим им паттерном экспрессии генов, например, положительными и/или отрицательными эффектами, такими как конститутивная экспрессия или временная, пространственная, развивающаяся, тканевая, экологическая, физиологическая, патологическая, связанная с клеточным циклом и/или химически чувствительная экспрессия, и любой их комбинацией, а также количественным или качественным показателям. Используемый в данном документе термин «паттерн экспрессии гена» представляет собой любой паттерн транскрипции функционально связанной молекулы ДНК в транскрибированную молекулу РНК. Транскрибированная молекула РНК может транслироваться для получения молекулы белка или может предоставлять антисмысловую или другую регуляторную молекулу РНК, такую как двухцепочечная РНК (дцРНК), трансферная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), микроРНК (миРНК) и тому подобное.

[0079] Используемый в данном документе термин «экспрессия белка» представляет собой любой паттерн трансляции транскрибированной молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессия белка может характеризоваться его временными, пространственными, развивающимися или морфологическими качествами, а также количественными или качественными показателями.

[0080] Промотор применим в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной



транскрибируемой молекулы ДНК. Используемый в данном документе термин «промотор» обычно 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 может быть первоначально выделен из 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) геномной копии гена. Альтернативно, промоторы могут быть синтетически произведенными или модифицированными молекулами ДНК. Промоторы также могут быть химерными. Химерные промоторы получают путем слияния двух или более гетерологичных молекул ДНК. Промоторы, применимые для реализации на практике настоящего изобретения, включают промоторные элементы, содержащиеся в любой из SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39 или их фрагментах или вариантах. В конкретных вариантах осуществления изобретения заявленные молекулы ДНК и любые их варианты или производные, как описано в настоящем документе, дополнительно определены как включающие активность промотора, *то есть*, они способны действовать в качестве промотора в клетке-хозяине, такой как клетка трансгенного растения. В еще других конкретных вариантах осуществления фрагмент может быть определен как проявляющий активность промотора, которой обладает исходная молекула промотора, из которой он получен, или фрагмент может содержать «минимальный промотор», который обеспечивает основной уровень транскрипции и состоит из ТАТА-бокса или эквивалентной последовательности ДНК для распознавания и связывания комплекса РНК-полимеразы II для инициации транскрипции.

**[0081]** В одном варианте осуществления представлены фрагменты последовательности промотора, раскрытой в данном документе. Фрагменты промотора могут содержать активность промотора, как описано выше, и могут быть применимы по отдельности или в комбинации с другими промоторами и фрагментами промотора, например, при конструировании химерных промоторов, или в комбинации с другими элементами экспрессии и фрагментами элемента экспрессии. В конкретных вариантах осуществления предусмотрены фрагменты промотора, содержащие по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 95, по

меньшей мере около 100, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 175, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 225, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 275, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 750, по меньшей мере приблизительно 800, по меньшей мере около 900 или по меньшей мере около 1000 смежных нуклеотидов или более молекулы ДНК, обладающей активностью промотора, в соответствии с описанным в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретение предоставляет фрагменты промотора, представленного в настоящем документе, обладающие активностью последовательности полной длины. Способы получения таких фрагментов из исходной промоторной молекулы хорошо известны в данной области.

[0082] Композиции, полученные из любого из промоторных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39, такие как, например, внутренние или 5'-делеции, могут быть изготовлены с использованием способов, известных в данной области, для улучшения или изменения экспрессии, в том числе путем удаления элементов, которые оказывают положительное или отрицательное влияние на экспрессию; дублирующие элементы, которые оказывают положительное или отрицательное влияние на экспрессию и/или дублирование или удаление элементов, которые оказывают тканеспецифическое или клеточноспецифическое воздействие на экспрессию. Композиции, полученные из любого из промоторных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39, состоящие из 3'-делеций, в которых элемент ТАТА-бокса или его эквивалентная последовательность и последующая последовательность далее по ходу транскрипции удалены могут быть использованы, например, для создания элементов энхансера. Дальнейшие делеции могут быть выполнены для удаления любых элементов, которые оказывают положительный или отрицательный; тканеспецифический, клеточноспецифический или времяспецифический (например, не ограничиваясь ими, циркадный ритм) эффекты на экспрессию. Любой из промоторных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39

и полученных из них фрагментов или энхансеров, можно использовать для получения композиций химерных транскрипционных регуляторных элементов.

**[0083]** В соответствии с изобретением промотор или фрагмент промотора можно анализировать на наличие известных элементов промотора, *то есть*, характеристик последовательности ДНК, таких как ТАТА-бокс и другие известные мотивы сайтов связывания транскрипционных факторов. Идентификация таких известных элементов промотора может быть использована специалистом в данной области для разработки вариантов промотора, имеющего паттерн экспрессии, сходный с исходным промотором.

**[0084]** Используемый в данном документе термин «лидер» относится к молекуле ДНК, выделенной из 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена и обычно определяемой как нуклеотидный сегмент между сайтом начала транскрипции (TSS) и сайтом начала кодирующей последовательности белка. С другой стороны, лидеры могут быть синтетически произведенными или модифицированными молекулами ДНК. Лидер может быть использован в качестве 5' регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные молекулы могут быть использованы с гетерологичным промотором или с их нативным промотором. Лидеры, применимые для реализации на практике настоящего изобретения, включают SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 и 40 или любой из лидерных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 и 45, или их фрагменты или варианты. В конкретных вариантах осуществления такие последовательности ДНК могут быть определены как способные действовать в качестве лидера в клетке-хозяине, включая, например, трансгенную растительную клетку. В одном варианте осуществления такие последовательности декодируются как содержащие лидерную активность.

**[0085]** Лидерные последовательности (также называемые 5' UTR), представленные в виде SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 и 40, или любого из лидерных элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30 и 43, могут состоять из регуляторных элементов или могут принимать

вторичные структуры, которые могут оказывать влияние на транскрипцию или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные последовательности, представленные в виде SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 и 40 или любого из лидерских элементов, содержащихся в любой из SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 и 45 могут быть использованы в соответствии с изобретением для создания химерных регуляторных элементов, которые влияют на транскрипцию или трансляцию функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК.

**[0086]** Используемый в данном документе термин «интрон» относится к молекуле ДНК, которая может быть выделена или идентифицирована из гена и может быть определена, как правило, как область, удаленная при сплайсинге во время процессинга матричной РНК (мРНК) перед трансляцией. Альтернативно, интрон может быть синтетически произведенным или модифицированным элементом ДНК. Интрон может содержать энхансерные элементы, которые влияют на транскрипцию функционально связанных генов. Интрон может быть использован в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Конструкция может содержать интрон, и интрон может быть или не быть гетерологичным по отношению к транскрибируемой молекуле ДНК. Примеры интронов, известных в данной области, включают рисовый актиновый интрон и кукурузный интрон HSP70.

**[0087]** У растений включение некоторых интронов в генные конструкции приводит к увеличению накопления мРНК и белка по сравнению с конструкциями, в которых отсутствует интрон. Этот эффект был назван «интрон-опосредованным усилением» (IME) экспрессии генов. Известно, что интроны, стимулирующие экспрессию в растениях, были идентифицированы в генах кукурузы (например, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* и *Ubi1*), в генах риса (например, *tpi*) и в генах двудольных растений, таких как петунии (например, *rbcS*), картофеля (например, *st-lsl*) и из *Arabidopsis thaliana* (например, *ubq3* и *pat1*). Было показано, что делеции или мутации в сайтах сплайсинга интрона снижают экспрессию генов, указывая

на то, что сплайсинг может быть необходим для IME. Однако IME у двудольных растений было показано точечными мутациями в сайтах сплайсинга гена *pat1* из *A. thaliana*. Было показано, что многократное использование одного и того же интрона на одном растении имеет недостатки. В этих случаях необходимо иметь набор основных контрольных элементов для конструирования соответствующих элементов рекомбинантной ДНК. Типичные интроны, применимые для реализации на практике настоящего изобретения, представлены в виде SEQ ID NO:9, 11, 17, 33 и 41.

**[0088]** Используемые в данном документе термины «молекула терминации транскрипции 3'», «3' нетранслируемая область» или «3'-нетранслируемой области» относятся к молекуле ДНК, которая используется во время транскрипции в нетранслируемую область 3'-части молекулы мРНК. 3'-нетранслируемая область молекулы мРНК может быть создана путем специфического расщепления и 3'-полиаденилирования, также известного как полиА-хвост. 3'-нетранслируемая область может быть расположена далее по ходу транскрипции относительно транскрибируемой молекулы ДНК и функционально связана с ней, а также может включать сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, способные влиять на транскрипцию, процессинг мРНК или экспрессию генов. Считается, что полиА-хвосты принимают участие в обеспечении стабильности мРНК и в инициации трансляции. Примерами молекул терминации транскрипции 3' в данной области являются область 3' нопалинсинтазы; область 3' пшеницы *hsp17*, область 3' малых субъединиц РуБисКо гороха, область 3' хлопчатника Е6 и 3'-нетранслируемая область койсина.

**[0089]** 3'-нетранслируемые области обычно находят полезное применение для рекомбинантной экспрессии специфических молекул ДНК. Слабая 3'-нетранслируемая область обладает надлежащим потенциалом для генерации считывания, что может повлиять на экспрессию молекулы ДНК, расположенной в соседних кассетах экспрессии. Соответствующий контроль терминации транскрипции может предотвращать считывание последовательностей ДНК (например, других кассет экспрессии), расположенных впереди по ходу транскрипции, и может дополнительно позволить эффективную

рециркуляцию РНК-полимеразы для улучшения экспрессии генов. Эффективное прекращение транскрипции (высвобождение РНК-полимеразы II из ДНК) является необходимым условием для повторной инициации транскрипции и, таким образом, напрямую влияет на общий уровень транскрипции. После терминации транскрипции зрелая мРНК высвобождается из сайта синтеза и переносится в цитоплазму. Эукариотические мРНК накапливаются *in vivo* в виде поли(А)-форм, что затрудняет обнаружение сайтов терминации транскрипции обычными способами. Тем не менее, прогнозирование местонахождения функциональных и эффективных 3'-нетранслируемых областей с использованием способов биоинформатики затруднено отсутствием консервативных последовательностей ДНК, которые позволили бы легко прогнозировать наличие эффективной 3'-нетранслируемой области.

[0090] С практической точки зрения, как правило, выгодно, чтобы 3'-нетранслируемая область, используемая в кассете экспрессии, обладала следующими характеристиками. Во-первых, 3'-нетранслируемая область должна иметь возможность эффективно и действительно терминировать транскрипцию транскрипта и предотвращать считывание транскрипта в любую соседнюю последовательность ДНК, которая может состоять из другой кассеты экспрессии, как в случае множества кассет экспрессии, находящихся на одной транспортной ДНК (Т-ДНК), или соседней хромосомной ДНК, в которую вставлена Т-ДНК. Во-вторых, 3'-нетранслируемая область не должна вызывать снижение транскрипционной активности, передаваемой промотором, лидером, энхансерами и интронами, которые используются для стимуляции экспрессии молекулы ДНК. Наконец, в биотехнологии растений 3'-нетранслируемая область часто используется для инициации реакций амплификации обратной транскрипированной РНК, выделенной из трансформированного растения и используемой для: (1) оценки транскрипционной активности или экспрессии кассеты экспрессии после интеграции в хромосому растения; (2) оценки количества копий вставок в ДНК растения и (3) оценки зиготности полученных семян после размножения. 3'-нетранслируемая область также используется в реакциях амплификации ДНК, выделенной из трансформированного

растения, для оценки неповрежденности вставленной кассеты. 3'-нетранслируемая область, применимая для реализации на практике настоящего изобретения, представлена в виде SEQ ID NO:29, 34, 35, 36, 37 и 44.

**[0091]** Используемый в данном документе термин «энхансер» или «энхансерный элемент» относится к *цис*-действующему регуляторному элементу, так называемому *цис*-элементу, который придает аспект общей модели экспрессии, но обычно его недостаточно для стимуляции транскрипции функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. В отличие от промоторов, энхансерные элементы обычно не включают сайт начала транскрипции (TSS) или TATA-бокс или эквивалентную последовательность ДНК. Промотор или фрагмент промотора могут естественным образом содержать один или несколько энхансерных элементов, которые влияют на транскрипцию функционально связанной последовательности ДНК. Элемент энхансера также может быть слит с промотором для получения химерного *цис*-элемента промотора, который придает аспект общей модуляции экспрессии гена. Пример энхансерного элемента, полученного из синтетического промотора, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), представлен как SEQ ID NO:24 (E-At.GSP571.nno:1).

**[0092]** Считается, что многие промоторные энхансерные элементы связывают ДНК-связывающие белки и/или влияют на топологию ДНК, создавая локальные конформации, которые избирательно разрешают или ограничивают доступ РНК-полимеразы к матрице ДНК или которые способствуют селективному открытию двойной спирали на сайте инициации транскрипции. Элемент энхансера может обеспечивать связывание транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию. Некоторые энхансерные элементы связывают более одного транскрипционного фактора, и транскрипционные факторы могут взаимодействовать с различной аффинностью с более чем одним энхансерным доменом. Элементы энхансера могут быть идентифицированы с помощью ряда методик, включая делеционный анализ, то есть, удаление одного или нескольких нуклеотидов с 5'-конца или из внутренней части промотора; анализ связывания ДНК с использованием ДНКазы I

интерференция метилирования; анализ изменения электрофоретической подвижности; геномный футпринтинг *in vivo* посредством опосредованной лигированием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и другие общепринятые анализы или анализы сходства последовательностей ДНК с использованием известных мотивов *цис*-элементов или энхансерных элементов в качестве последовательности-мишени или мотива-мишени с помощью традиционных методов сравнения последовательностей ДНК, таких как BLAST. Тонкая структура энхансерного домена может быть дополнительно изучена мутагенезом (или замещением) одного или нескольких нуклеотидов или другими общепринятыми способами, известными в данной области. Энхансерные элементы могут быть получены химическим синтезом или выделением из регуляторных элементов, которые включают такие элементы, и они могут быть синтезированы с дополнительными фланкирующими нуклеотидами, которые содержат применимые сайты рестрикционных ферментов для облегчения манипулирования подпоследовательностью. Таким образом, данное изобретение охватывает разработку, конструирование и использование энхансерных элементов в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе, для модуляции экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК. Примерный энхансер, полезный при практическом применении этого изобретения, представлен как SEQ ID NO:24.

**[0093]** Используемый в данном документе термин «химерный» относится к одной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, где ни первая, ни вторая молекулы ДНК обычно не обнаруживаются в этой конфигурации, то есть, не сливаются друг с другом. Таким образом, химерная молекула ДНК является новой молекулой ДНК, которая обычно не встречается в природе. Используемый в данном документе термин «химерный промотор» относится к промотору, полученному путем таких манипуляций с молекулами ДНК. Химерный промотор может объединять два или более фрагмента ДНК, например, слияние промотора с энхансерным элементом. Таким образом, данное изобретение охватывает разработку, конструирование и использование химерных промоторов в соответствии со способами,



раскрытыми в данном документе, для модуляции экспрессии функционально связанных транскрибируемых молекул ДНК. Примерный химерный промотор представлен здесь как SEQ ID NO:25 (P-At.GSP571/442).

**[0094]** Химерные регуляторные элементы могут быть разработаны с возможностью включения различных составляющих элементов, которые могут быть функционально связаны различными способами, известными в данной области, такими как расщепление и лигирование рестрикционных ферментов, независимое от лигирования клонирование, модульная сборка продуктов ПЦР во время амплификации или прямой химический синтез регуляторного элемента, а также другие способы, известные в технике. Получающиеся в результате различные химерные регуляторные элементы могут состоять из одинаковых или вариантов одинаковых составляющих элементов, но различаться по последовательности ДНК или последовательностям ДНК, которые содержат связывающую последовательность ДНК или последовательности, которые позволяют составным частям быть функционально связанными. В изобретении последовательности ДНК, представленные в виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, могут обеспечивать эталонные последовательности регуляторных элементов, причем составляющие элементы, которые составляют контрольную последовательность, могут быть соединены способами, известными в данной области техники, и может содержать замены, делеции и/или вставки одного или нескольких нуклеотидов или мутаций, которые естественным образом происходят при трансформации бактериальных и растительных клеток.

**[0095]** Используемый в данном документе термин «вариант» относится ко второй молекуле ДНК, такой как регуляторный элемент, который по составу аналогичен, но не идентичен первой молекуле ДНК, и где вторая молекула ДНК все еще сохраняет общую функциональность, то есть, тот же или сходный паттерн экспрессии, например, посредством более или менее эквивалентной транскрипционной активности первой молекулы ДНК. Вариант может представлять собой более короткую или усеченную версию первой молекулы ДНК или измененную версию последовательности первой молекулы ДНК, такую как версия с различными сайтами

рестрикционных ферментов и/или внутренними делециями, заменами или вставками. «Вариант» также может включать регуляторный элемент, имеющий нуклеотидную последовательность, содержащую замену, делецию или вставку одного или нескольких нуклеотидов эталонной последовательности, где производный регуляторный элемент обладает большей или меньшей или эквивалентной транскрипционной или трансляционной активностью по сравнению с соответствующей родительской регуляторной молекулой. В настоящем изобретении полинуклеотидная последовательность, представленная в виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, может быть использована для создания вариантов, которые сходны по составу, но не идентичны последовательности ДНК исходного регуляторного элемента, сохраняя при этом общую функциональность, т. е., тот же паттерн экспрессии, что и у исходного регуляторного элемента, или подобный ему. Изготовление таких вариантов изобретения находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области в свете данного раскрытия и входит в объем изобретения.

**[0096]** Эффективность описанных в данном документе модификаций, дупликаций или делеций в отношении желаемых аспектов экспрессии конкретного транскена может быть проверена эмпирически при выполнении анализов стабильной и транзиторной экспрессии у растений, таких как описанные в рабочих примерах, с целью подтверждения результатов, которые могут варьироваться в зависимости от внесенных изменений и цели изменения исходной молекулы ДНК.

#### Конструкции

**[0097]** Используемый в данном описании термин «конструкция» означает любую молекулу рекомбинантной ДНК, такую как плазмид, космид, вирус, фаг, или линейная или кольцевая молекула ДНК или РНК, полученная из любого источника, способного к геномной интеграции или автономной репликации, содержащего молекулу ДНК, причем по меньшей мере одна молекула ДНК была связана с другой молекулой ДНК функционально действенным образом, т. е., функционально связана. Используемый в данном документе термин «вектор» означает любую конструкцию, которая может быть использована с целью трансформации, то есть, введения

гетерологичной ДНК или РНК в клетку-хозяина. Конструкция обычно включает в себя одну или несколько кассет экспрессии. Используемый в данном документе термин «кассета экспрессии» относится к молекуле ДНК, содержащей по меньшей мере транскрибируемую молекулу ДНК, функционально связанную с одним или несколькими регуляторными элементами, обычно по меньшей мере с промотором и 3'-нетранслируемой областью.

**[0098]** Используемый в данном описании, термин «функционально связанные» относится к соединению первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, в котором первая и вторая молекулы ДНК расположены таким образом, что первая молекула ДНК влияет на функцию второй молекулы ДНК. Две молекулы ДНК могут быть или не быть частью одной смежной молекулы ДНК и могут быть или не быть смежными. Например, промотор функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, если промотор модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой молекулы ДНК в клетке. Лидер, например, функционально связан с последовательностью ДНК, когда он способен влиять на транскрипцию или трансляцию последовательности ДНК.

**[0099]** Конструкции в соответствии с изобретением могут быть представлены в одном варианте в виде двойных плазмидных пограничных конструкций, индуцирующих опухоль (Ti), которые имеют правую граничную (RB или AGRtu.RB) и левую граничную (LB или AGRtu.LB) области плазмиды Ti, выделенной из *Agrobacterium tumefaciens*, включающей Т-ДНК, которая, наряду с переносящими молекулами, обеспечиваемыми клетками *A. tumefaciens*, позволяет интегрировать Т-ДНК в геном растительной клетки (см., например, патент США 6,603,061). Конструкции могут также содержать сегменты ДНК плазмидного остова, которые обеспечивают функцию репликации и отбор антибиотиков в бактериальных клетках, например, точку начала репликации *Escherichia coli*, такую как ori322, точки начала репликации широкого диапазона хозяев, такие как oriV или oriRi, и кодирующую область для селективируемого маркера, такого как Spec/Strp, который кодирует аминогликозидаденилтрансферазу Tn7 (*aadA*), придающую устойчивость к спектиномицину или стрептомицину, или гена

селектируемого маркера 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, также могут быть использованы в изобретении.

**[00100]** В данной области техники известны способы сборки и введения конструкций в клетку таким образом, что транскрибируемая молекула ДНК транскрибируется в функциональную молекулу мРНК, которая транслируется и экспрессируется в виде белка. Для практического применения изобретения типичные композиции и способы получения и использования конструкций и клеток-хозяев хорошо известны специалисту в данной области. Типичные векторы, используемые для экспрессии нуклеиновых кислот в высших растениях, хорошо известны в данной области и включают векторы, полученные из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* и вектора контроля переноса pCaMVN.

**[00101]** В конструкцию могут быть включены различные конструктивные элементы, в том числе любые из представленных в данном документе. Любые такие регуляторные элементы могут предоставляться в сочетании с другими регуляторными элементами. Такие комбинации могут быть спроектированы или модифицированы для получения желательных регуляторных признаков. В одном варианте осуществления конструкции в соответствии с изобретением содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с транскрибируемой молекулой ДНК, функционально связанной с 3'-нетранслируемой областью.

**[00102]** Конструкции в соответствии с изобретением могут включать в себя любой промотор или лидер, предоставленные в настоящем документе или известные в данной области. Например, промотор в соответствии с изобретением может быть функционально связан с гетерологичным нетранслируемым 5'-лидером, таким как ген, происходящий от гена белка теплового шока. Альтернативно, лидер в соответствии с изобретением может быть функционально связан с гетерологичным промотором, таким как промотор транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты.

**[00103]** Кассеты экспрессии могут также включать кодирующую

последовательность транзитного пептида, которая кодирует пептид, применим для субклеточного нацеливания функционально связанного белка, в частности на хлоропласт, лейкопласт или другую пластидную органеллу; митохондрию; пероксис; вакуоль; или внеклеточное местоположение. Многие локализованные в хлоропластах белки экспрессируются из ядерных генов в качестве предшественников и нацеливаются на хлоропласт транзитным пептидом хлоропласта (СТР). Примеры таких выделенных хлоропластных белков включают, но не ограничиваются ими, белки, связанные с малой субъединицей (SSU) рибулозо-1,5 - бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксин, оксидоредуктазу ферредоксина, белок I и белок II светособирающего комплекса, тиоредоксин F и енолпирувилшикиматфосфатсинтазу (EPSPS). Транзитные пептиды хлоропласта описаны, например, в патенте США № 7,193,133. Было продемонстрировано, что нехлоропластные белки могут быть нацелены на хлоропласт посредством экспрессии гетерологичной СТР, функционально связанной с трансгеном, кодирующим нехлоропластные белки.

#### Транскрибируемые молекулы ДНК

**[00104]** Используемый в данном документе термин «транскрибируемая молекула ДНК» относится к любой молекуле ДНК, способной транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, молекулы, имеющие последовательности, кодирующие белок, и молекулы, продуцирующие молекулы РНК, имеющие последовательности, применимые для подавления генов. Тип молекулы ДНК может включать, не ограничиваясь ими, молекулу ДНК из того же растения, молекулу ДНК из другого растения, молекулу ДНК из другого организма или синтетическую молекулу ДНК, такую как молекула ДНК, содержащая антисмысловое сообщение гена, или молекула ДНК, кодирующей искусственную, синтетическую или иным образом модифицированную версию трансгена. Типичные транскрибируемые молекулы ДНК для включения в конструкции в соответствии с изобретением включают, например, молекулы или гены ДНК из вида, отличного от вида, в который включена молекула ДНК, или гены, которые происходят или присутствуют в тех же видах, но являются включены в клетки реципиента методами генной

инженерии, а не классическими методами селекции.

[00105] « Трансген » относится к транскрибируемой молекуле ДНК, гетерологичной по отношению к клетке-хозяину, по меньшей мере в отношении ее расположения в геноме клетки-хозяина и/или транскрибируемой молекуле ДНК, искусственно включенной в геном клетки-хозяина в текущем или любом предшествующем поколении клеток.

[00106] Регуляторный элемент, такой как синтетический промотор по настоящему изобретению, может быть функционально связан с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Используемый в данном документе термин «гетерологичный» относится к комбинации двух или более молекул ДНК в случаях, когда такая комбинация не встречается в природе в нормальных условиях. Например, две молекулы ДНК могут быть получены из разных видов, и/или две молекулы ДНК могут быть получены из разных генов, например, разных генов одного и того же вида или одних и те же генов разных видов, или одна из молекул ДНК может быть синтетической и не встречаться в природе. Регуляторный элемент является гетерологичным по отношению к функционально связанной транскрибируемой молекуле ДНК, если такой комбинация обычно не встречается в природе, то есть, в естественных условиях транскрибируемая молекула ДНК не является функционально связанной с регуляторным элементом.

[00107] Транскрибируемая молекула ДНК, как правило, может быть любой молекулой ДНК, для которой желательна экспрессия транскрипта. Такая экспрессия транскрипта может привести к трансляции полученной молекулы мРНК и, таким образом, к экспрессии белка. Альтернативно, например, транскрибируемая молекула ДНК может быть сконструирована так, чтобы в конечном итоге вызывать снижение экспрессии конкретного гена или белка. В одном варианте осуществления это может быть достигнуто путем использования транскрибируемой молекулы ДНК, которая ориентирована в антисмысловом направлении. Специалист в данной области техники знаком с использованием такой антисмысловой технологии. Таким образом, любой ген может быть подвергнут негативной регуляции, и в одном варианте осуществления

транскрибируемая молекула ДНК может быть разработана для подавления конкретного гена посредством экспрессии молекулы дцРНК, миРНК или микроРНК.

**[00108]** Таким образом, одним вариантом осуществления изобретения является молекула рекомбинантной ДНК, содержащая регуляторный элемент по изобретению, такой как молекулы, представленные в виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45, функционально связанные с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК образом, способствующим модуляции транскрипции транскрибируемой молекулы ДНК на желаемом уровне или желаемым образом в случае, когда конструкция интегрирована в геном трансгенной растительной клетки. В одном варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК содержит кодирующую белок область гена, а в другом варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК содержит антисмысловую область гена.

Гены, представляющие агрономический интерес

**[00109]** Транскрибируемая молекула ДНК может представлять собой ген, представляющий агрономический интерес. Используемый в данном документе термин «ген, представляющий агрономический интерес» относится к транскрибируемой молекуле ДНК, которая при экспрессии в конкретной растительной ткани, клетке или типе клетки придает желаемую характеристику. Вещество, вырабатываемое геном, представляющим агрономический интерес, может действовать в растении, оказывая влияние на морфологию растения, его физиологию, рост, развитие, урожайность, состав зерен, профиль питания, устойчивость к болезням или вредителям и/или устойчивость к окружающей среде или химическим веществам, или может действовать как пестицидный агент в рационе вредителя, который питается растением. В одном варианте осуществления изобретения регуляторный элемент по изобретению включен в конструкцию таким образом, что регуляторный элемент функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, которая представляет собой ген, представляющий агрономический интерес. В трансгенном растении, содержащем такую конструкцию, экспрессия гена, представляющего агрономический интерес может придать полезный агрономический признак. Полезный агрономический признак

может включать, например, но не ограничиваясь ими: устойчивость к гербицидам, борьбу с насекомыми, изменение урожайности, устойчивость к болезням, устойчивость к патогенам, изменение роста и развития растений, изменение содержания крахмала, изменение содержания масла, изменение содержания жирных кислот, изменение содержания белка, изменение созревания плодов, повышенную питательность для животных и человека, выработку биополимеров, устойчивость к экологическим стрессам, фармацевтические пептиды, улучшенные технологические качества, улучшенный вкус, полезность для производства гибридных семян, улучшенное производство волокон и желаемое производство биотоплива.

[00110] Примеры генов агрономического интереса, известных в данной области, включают, но не ограничиваются ими, гены устойчивости к гербицидам (патенты США №№ 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; и 5,463,175), повышенную урожайность (патенты США №№ USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; и 5,716,837), борьбу с насекомыми (патенты США №№ 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; и 5,763,241), устойчивость к грибковым заболеваниям (патенты США №№ 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; и 6,506,962), устойчивость к вирусам (патенты США №№ 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; и 5,304,730), устойчивость к нематодам (патент США №№ 6,228,992), устойчивость к бактериальным инфекциям (патент США №№ 5,516,671), рост и развитие растений (патенты США №№ 6,723,897 и 6,518,488), выработка крахмала (патенты США №№ 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876;



6,476,295), измененная выработка масел (патенты США №№ 6,444,876; 6,426,447; и 6,380,462), высокая выработка масел (патенты США №№ 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; и 6,476,295), измененное содержание жирных кислот (патенты США №№ 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; и 6,459,018), высокая выработка белка (патент США №№ 6,380,466), созревание фруктов (патент США №№ 5,512,466), повышенная питательность для животных и человека (патенты США №№ 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; и 6,171,640), биополимеры (патенты США №№ USRE37,543; 6,228,623; и 5,958,745, and 6,946,588), устойчивость к экологическим стрессам (патент США №№ 6,072,103), фармацевтические пептиды и секреторируемые пептиды (патенты США №№ 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; и 6,080,560), улучшенные характеристики обработки (патент США №№ 6,476,295), улучшенная перевариваемость (патент США №№ 6,531,648) низкое содержание раффинозы (патент США №№ 6,166,292), выработка промышленных ферментов (патент США №№ 5,543,576), улучшенный вкус (патент США №№ 6,011,199), фиксация азота (патент США №№ 5,229,114), производство гибридных семян (патент США №№ 5,689,041), производство волокон (патенты США №№ 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; и 5,869,720) и производство биотоплива (патент США №№ 5,998,700).

**[00111]** Альтернативно, ген, представляющий агрономический интерес может влиять на вышеупомянутые характеристики или фенотипы растений путем кодирования молекулы РНК, которая вызывает целевую модуляцию экспрессии гена эндогенного гена, например, посредством антисмысловых (см., например, патент США 5,107,065) с использованием ингибирующей РНК («RNAi», включая модуляцию экспрессии генов с помощью miRNA-, siRNA-, транс-действующей siRNA- и поэтапных sRNA-опосредованных механизмов, например, как описано в опубликованных заявках US 2006/0200878 и US 2008/0066206 и в заявке на патент США 11/974,469) или опосредованных косупрессией механизмов. РНК также может представлять собой молекулу каталитической РНК (например, рибозим или рибосвитч; см., например, US 2006/0200878), сконструированную для расщепления желаемого эндогенного продукта

мРНК. В данной области техники известны способы конструирования и введения конструкций в клетку таким образом, что транскрибируемая молекула ДНК транскрибируется в молекулу, способную вызывать супрессию генов.

#### Селективные маркеры

**[00112]** Селективные маркерные трансгены также могут использоваться с регуляторными элементами по изобретению. Используемый в данном документе термин «селектируемый маркерный трансген» относится к любой транскрибируемой молекуле ДНК, экспрессия которой в трансгенном растении, ткани или клетке или ее отсутствие может быть подвергнута скринингу или оценена каким-либо образом. Селектируемые маркерные гены и связанные с ними методы отбора и скрининга для применения в практике изобретения известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, транскрибируемые молекулы ДНК, кодирующие β-глюкуронидазу (GUS), зеленый флуоресцентный белок (GFP.), белки, которые придают устойчивость к антибиотикам, и белки, которые придают устойчивость к гербицидам. Пример селектируемого маркерного трансгена представлен в виде SEQ ID NO:42.

#### Трансформация клеток

**[00113]** Изобретение также относится к способу получения трансформированных клеток и растений, которые содержат один или несколько регуляторных элементов, функционально связанных с транскрибируемой молекулой ДНК.

**[00114]** Термин «трансформация» относится к введению молекулы ДНК в реципиента-хозяина. Используемый в данном документе термин «хозяин» относится к бактериям, грибам или растениям, включая любые клетки, ткани, органы или потомство бактерий, грибов или растений. Ткани и клетки растений, представляющие особый интерес, включают протопласты, каллусы, корни, клубни, семена, стебли, листья, рассаду, эмбрионы и пыльцу.

**[00115]** Используемый в данном документе термин «трансформированный» относится к клетке, ткани, органу или организму, в которые была введена чужеродная молекула ДНК, например, конструкция. Введенная молекула ДНК может быть

интегрирована в геномную ДНК клетки, ткани, органа или организма реципиента таким образом, что введенная молекула ДНК наследуется последующим потомством. «Трансгенная» или «трансформированная» клетка или организм может также включать в себя потомство клетки или организма и потомство, полученное в результате программы разведения, использующей такой трансгенный организм в качестве родителя при скрещивании и проявляющей измененный фенотип, возникающий в результате присутствия чужеродной молекулы ДНК. Введенная молекула ДНК также может быть временно введена в клетку реципиента таким образом, что введенная молекула ДНК не наследуется последующим потомством. Термин «трансгенный» относится к бактерии, грибу или растению, содержащим одну или несколько гетерологичных молекул ДНК.

[00116] Существует много хорошо известных специалистам в данной области способов введения молекул ДНК в растительные клетки. Процесс обычно включает в себя этапы выбора 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 в практике данного изобретения могут включать любой из хорошо известных и продемонстрированных способов. Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, бактериальную инфекцию (например, *Agrobacterium*), бинарные векторы ВАС, прямую доставку ДНК (например, посредством PEG-опосредованной трансформации, опосредованному обезвоживанием/ингибированием поглощению ДНК, электропорации, возбуждению волокнами карбида кремния и ускорению частиц, покрытых ДНК) и редактирование генов (например, системы CRISPR-Cas), среди других.

[00117] Данное раскрытие дополнительно предполагает, что раскрытые элементы синтетической экспрессии могут быть созданы *in planta* с использованием различных методов редактирования генов, известных в данной области техники. Такие технологии, используемые для редактирования генома, включают, но не ограничиваются ими, ZFN (нуклеаза цинкового пальца), мегануклеазы, TALEN (эффекторные нуклеазы, подобные активатору

транскрипции) и CRISPR (кластеризованные регулярно пересекающиеся короткие палиндромные повторы)/Cas (CRISPR-ассоциированный) системы. Такие способы редактирования генома можно использовать для изменения последовательности элемента экспрессии в клетке растения на другую последовательность.

**[00118]** Клетками-хозяевами могут быть любые клетки или организмы, такие как клетки растений, клетки водорослей, водоросли, клетки грибов, грибы, бактериальные клетки или клетки насекомых. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева и трансформированные клетки могут включать клетки из сельскохозяйственных растений.

**[00119]** Трансгенное растение впоследствии может быть регенерировано из трансгенной растительной клетки в соответствии с изобретением. Из такого трансгенного растения могут быть получены семена с использованием стандартных способов размножения или самоопыления. Такое семя и полученное растение-потомок, выращенное из такого семени, будут содержать молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением и, следовательно, будут трансгенными.

**[00120]** Трансгенные растения в соответствии с изобретением могут самоопыляться для получения семян в случае гомозиготных трансгенных растений в соответствии с изобретением (гомозиготных по молекуле рекомбинантной ДНК) или скрещиваться с нетрансгенными растениями или различными трансгенными растениями для получения семян в случае гетерозиготных трансгенных растений в соответствии с изобретением (гетерозиготные по молекуле рекомбинантной ДНК). Как такие гомозиготные, так и гетерозиготные трансгенные растения обозначаются здесь как «растения-потомки». Растения-потомки представляют собой трансгенные растения, происходящие от исходного трансгенного растения и содержащие молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением. Семена, полученные с использованием трансгенного растения в соответствии с изобретением, можно собирать и использовать для выращивания поколений трансгенных растений, т. е., растений-потомков в соответствии с изобретением, содержащих конструкцию по настоящему изобретению и экспрессирующих ген,

представляющий агрономический интерес. Описания методов селекции, которые обычно используются для разных 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) and *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

**[00121]** Трансформированные растения могут быть проанализированы на наличие гена или генов, представляющих интерес и уровни экспрессии и/или профиль, обеспечиваемый регуляторными элементами по изобретению. Специалистам в данной области известны многочисленные методы, доступные для анализа трансформированных растений. Например, методы анализа растений включают, но не ограничиваются ими, саузерн-блоты или нозерн-блоты, подходы на основе ПЦР, биохимические анализы, методы фенотипического скрининга, полевые оценки и иммунодиагностические анализы. Экспрессия транскрибируемой молекулы ДНК может быть измерена с использованием реагентов и способов TaqMan® (Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния) в соответствии с описанием производителя, количество циклов ПЦР определяется с использованием матрицы тестирования TaqMan®. Кроме того, для оценки экспрессии трансгена могут быть использованы реагенты и способы Invader® (Third Wave Technologies, Мэдисон, Висконсин) в соответствии с описанием производителя.

**[00122]** Изобретение также предусматривает части растения в соответствии с изобретением. Части растения включают, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, клубни, семена, эндосперм, яйцеклетку и пыльцу. Части растений в соответствии с

изобретением могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми и/или нерегенерируемыми. Изобретение также включает и обеспечивает трансформированные растительные клетки, содержащие молекулу ДНК в соответствии с изобретением. Трансформированные или трансгенные растительные клетки в соответствии с изобретением включают регенерируемые и/или нерегенерируемые растительные клетки.

**[00123]** Изобретение также обеспечивает товарный продукт, который получают из трансгенного растения или его части, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением. Товарные продукты в соответствии с изобретением содержат определенное количество ДНК, включающее последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO:43-45. Используемый в данном документе термин «товарный продукт» относится к любой композиции или продукту, которые состоят из материала, полученного из трансгенного растения, семени, клетки растения или части растения, содержащих молекулу рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением. Товарные продукты включают, но не ограничиваются ими, обработанные семена, зерна, части растений и крупу. Товарный продукт в соответствии с изобретением будет содержать определенное количество ДНК, соответствующее молекуле рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением. Обнаружение одной или нескольких из этой ДНК в образце может быть использовано для определения содержания или источника товарного продукта. Может быть использован любой стандартный метод обнаружения молекул ДНК, включая способы обнаружения, раскрытые в данном документе.

**[00124]** Изобретение может быть более легко понято посредством ссылок на последующие примеры, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения, если не указано иное. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, раскрытые в следующих примерах, представляют собой методики, открытые изобретателем, которые хорошо функционируют при практическом осуществлении данного изобретения. Однако специалистам в данной области

техники в свете настоящего раскрытия должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах осуществления может быть выполнено множество изменений, и все же может быть получен тот же или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения, поэтому все материалы, изложенные или показанные на прилагаемых чертежах, должны интерпретироваться как иллюстративные, а не в ограничительном смысле.

#### **ПРИМЕРЫ**

Пример 1.

Разработка, синтез и клонирование синтетических регуляторных элементов

[00125] Регуляторные элементы, представленные в таблице 1, являются новыми синтетическими элементами экспрессии, разработанными с помощью алгоритмических методов. Данные искусственно разработанные синтетические регуляторные элементы были химически синтезированы и клонированы для создания групп синтетических регуляторных элементов экспрессии (EXR). Более 1000 синтетических регуляторных элементов были сконструированы и проанализированы в протопластах сои и стабильно трансформированных растениях сои для нахождения синтетических регуляторных элементов, обеспечивающих желаемые характеристики, такие как уровни экспрессии белка и паттерны экспрессии. Синтетические регуляторные элементы, описанные в таблице 1, обеспечивают различные паттерны экспрессии, применимые для стимуляции экспрессии многих различных кодирующих последовательностей и интерферирующих РНК, представляющих агрономический интерес.

[00126] Разработанные с использованием соответствующих компьютерных программ синтетические регуляторные элементы не имеют расширенной гомологии ни с какими известными последовательностями нуклеиновых кислот, которые существуют в природе. Синтетические EXR и соответствующие промоторы, лидеры, интроны и 3'-нетранслируемые области представлены в таблице 1. Синтетические EXR были клонированы с использованием способом, известных в данной области техники, в бинарные векторы трансформации растений, функционально связанные с кодирующей

последовательностью для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS), и векторы использовались для оценки уровней и паттернов экспрессии, обеспечиваемых синтетическими EXP в стабильно трансформированных растениях сои, хлопчатника и кукурузы.

**[00127]** Анализ исходного сайта транскрипции синтетического регуляторного элемента (TSS) и границы сплайсинга между интроном и экзоном может быть выполнен с использованием трансформированной растительной ткани. Вкратце, растения трансформируют растительными векторами экспрессии, содержащими клонированные фрагменты ДНК, функционально связанные с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Затем использовали систему 5' RACE для быстрой амплификации концов кДНК, версия 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) для подтверждения TSS синтетического регуляторного элемента и границы сплайсинга между интроном и экзоном путем анализа последовательности ДНК полученных транскриптов мРНК.

**Таблица 1. Группы синтетических транскрипционных регуляторных элементов экспрессии, промоторы, лидеры, интроны и 3'-нетранслируемые области.**

| Аннотация                           | SEQ ID NO: | Размер (п. н.) | Описание и/или регуляторные элементы EXP, связанные в направлении 5' → 3' (SEQ ID NO):            |
|-------------------------------------|------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EXP-<br>At.GSP442.nno+At.<br>Cyco:3 | 1          | 855            | EXP: P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) |
| P-At.GSP442.nno:2                   | 2          | 480            | Промотор                                                                                          |
| L-At.GSP442.nno:1                   | 3          | 20             | Лидер                                                                                             |
| EXP-At.GSP571                       | 4          | 500            | EXP: P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6)                             |
| P-At.GSP571.nno:5                   | 5          | 451            | Промотор                                                                                          |



|                                           |    |     |                                                                                                                       |
|-------------------------------------------|----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L-At.GSP571.nno:1                         | 6  | 49  | Лидер                                                                                                                 |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.<br>Cyco:2       | 7  | 855 | EXP: P-At.GSP571.nno:5<br>(SEQ ID NO:5), L-<br>At.GSP571.nno:1 (SEQ ID<br>NO:6), I-At.Cyco:2 (SEQ ID<br>NO:33)        |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.<br>GSI21.nno:10 | 8  | 816 | EXP: P-At.GSP571.nno:5<br>(SEQ ID NO:5), L-<br>At.GSP571.nno:1 (SEQ ID<br>NO:6), I-At.GSI21.nno:2<br>(SEQ ID NO:9)    |
| I-At.GSI21.nno:2                          | 9  | 309 | Интрон                                                                                                                |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.<br>GSI102.nno:1 | 10 | 810 | EXP: P-At.GSP571.nno:5<br>(SEQ ID NO:5), L-<br>At.GSP571.nno:1 (SEQ ID<br>NO:6), I-At.GSI102.nno:1<br>(SEQ ID NO:11)  |
| I-At.GSI102.nno:1                         | 11 | 310 | Интрон                                                                                                                |
| EXP-At.GSP564                             | 12 | 500 | EXP: P-At.GSP564.nno:3<br>(SEQ ID NO:13), L-<br>At.GSP564.nno:1 (SEQ ID<br>NO:14)                                     |
| P-At.GSP564.nno:3                         | 13 | 461 | Промотор                                                                                                              |
| L-At.GSP564.nno:1                         | 14 | 39  | Лидер                                                                                                                 |
| EXP-<br>At.GSP564.nno+At.<br>Cyco:2       | 15 | 855 | EXP: P-At.GSP564.nno:3<br>(SEQ ID NO:13), L-<br>At.GSP564.nno:1 (SEQ ID<br>NO:14), I-At.Cyco:2 (SEQ<br>ID NO:33)      |
| EXP-<br>At.GSP564.nno+At.<br>GSI17.nno:2  | 16 | 807 | EXP: P-At.GSP564.nno:3<br>(SEQ ID NO:13), L-<br>At.GSP564.nno:1 (SEQ ID<br>NO:14), I-At.GSI17.nno:1<br>(SEQ ID NO:17) |
| I-At.GSI17.nno:1                          | 17 | 300 | Интрон                                                                                                                |

|                                                       |    |      |                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------|----|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EXP-<br>At.GSP564.nno+At.<br>GSI102.nno:1             | 18 | 810  | EXP: P-At.GSP564.nno:3<br>(SEQ ID NO:13), L-<br>At.GSP564.nno:1 (SEQ ID<br>NO:14), I-At.GSI102.nno:1<br>(SEQ ID NO:11)                                                                 |
| EXP-At.GSP579                                         | 19 | 500  | EXP: P-At.GSP579.nno:2<br>(SEQ ID NO:20), L-<br>At.GSP579.nno:1 (SEQ ID<br>NO:21)                                                                                                      |
| P-At.GSP579.nno:2                                     | 20 | 449  | Промотор                                                                                                                                                                               |
| L-At.GSP579.nno:1                                     | 21 | 51   | Лидер                                                                                                                                                                                  |
| EXP-<br>At.GSP579.nno+At.<br>GSI102.nno:3             | 22 | 810  | EXP: P-At.GSP579.nno:2<br>(SEQ ID NO:20), L-<br>At.GSP579.nno:1 (SEQ ID<br>NO:21), I-At.GSI102.nno:1<br>(SEQ ID NO:11)                                                                 |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.<br>GSP442.nno+At.Cyc<br>o:1 | 23 | 1350 | EXP: E-At.GSP571.nno:1<br>(SEQ ID NO:24), P-<br>At.GSP442.nno:2 (SEQ ID<br>NO:2), L-At.GSP442.nno:1<br>(SEQ ID NO:3), L-At.Cyc-<br>o:1:2 (SEQ ID NO:40), I-<br>At.Cyc:2 (SEQ ID NO:33) |
| E-At.GSP571.nno:1                                     | 24 | 422  | Энхансер                                                                                                                                                                               |
| P-At.GSP571/442                                       | 25 | 902  | Химерный промотор E-<br>At.GSP571.nno:1 (SEQ ID<br>NO:24), P-At.GSP442.nno:2<br>(SEQ ID NO:2)                                                                                          |
| EXP-<br>At.GSP576.nno+At.<br>GSI17.nno:3              | 26 | 800  | EXP: P-At.GSP576.nno:4<br>(SEQ ID NO:27), L-<br>At.GSP576.nno:2 (SEQ ID<br>NO:28), I-At.GSI17.nno:1<br>(SEQ ID NO:17)                                                                  |
| P-At.GSP576.nno:4                                     | 27 | 458  | Промотор                                                                                                                                                                               |
| L-At.GSP576.nno:2                                     | 28 | 42   | Лидер                                                                                                                                                                                  |

|                                     |    |     |                                                                                                                                   |
|-------------------------------------|----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-Zm.GST59.nno:1                    | 29 | 400 | 3' UTR                                                                                                                            |
| EXP-<br>At.GSP221+At.Cyco<br>:3     | 30 | 947 | EXP: P-At.GSP221:3 (SEQ ID NO:31), L-At.GSP221:1 (SEQ ID NO:32), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)                                       |
| P-At.GSP221:3                       | 31 | 370 | Промотор                                                                                                                          |
| L-At.GSP221:1                       | 32 | 229 | Лидер                                                                                                                             |
| EXP-At.GSP442+L-<br>I-At.Cyco       | 43 | 928 | EXP: P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) |
| T-Zm.GST7.nno:2                     | 44 | 300 | 3' UTR                                                                                                                            |
| EXP-<br>At.GSP576.nno+At.<br>Cyco:1 | 45 | 855 | EXP: P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27), L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)                               |

### Пример 2.

**Анализ синтетических EXP: EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 и EXP-At.GSP221+At.Cyco:3, стимулирующих экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои**

[00128] Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп регуляторных элементов на экспрессию.

[00129] Растения сои трансформировали растительными конструкциями, экспрессирующими GUS, содержащими эндогенный EXP, EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38) и два синтетических EXP, EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) и EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30). EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38) получена из гена субъединицы VIa цитохром-с-оксидазы *Arabidopsis* и состоит из

промотора P-At.Сусо-1:1:2 (SEQ ID NO:39), функционально связанного 5' с лидером, L-At.Сусо-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Сусо:1:1:1 (SEQ ID NO:41). Каждый из EXP-At.GSP442.nno+At.Сусо:3 (SEQ ID NO:1) и EXP-At.GSP221+At.Сусо:3 (SEQ ID NO:30) содержит синтетический промотор и лидер, функционально связанный 5' с интроном I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33). Последовательность I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33) идентична последовательности I-At.Сусо-1:1:1 (SEQ ID NO:41), за исключением того, что она содержит два нуклеотида после сайта сплайсинга интрона, включенных в последовательность I-At.Сусо-1:1:1. Оба интрона I-At.Сусо срачиваются одинаково.

[00130] Регуляторные элементы были клонированы в базовые векторы экспрессии растений с использованием стандартных методов, известных в данной области. Полученные в результате векторы экспрессии растений содержали правую граничную область от *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.right border), первую кассету для отбора трансгенов, используемую для отбора трансформированных растительных клеток, которые придают устойчивость к антибиотику спектиномицину; вторую кассету трансгена для оценки активности регуляторного элемента, который содержит последовательность EXP, функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для β-глюкуронидазы (GUS, GOI-Ес.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) содержащей модифицируемый интрон, полученный из светочувствительного тканеспецифического гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный 5' с 3'-нетранслируемой областью гена *Gossypium barbadense* FbLate-2 (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36) и левой граничной областью *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.left border).

[00131] Клетки растений сои трансформировали опосредованной *Agrobacterium* трансформацией с использованием данных конструкций вектора бинарной трансформации, как хорошо известно в данной области. Полученные трансформированные растительные клетки индуцировали с образованием цельных растений сои.

[00132] Для качественного и количественного анализа

экспрессии трансформированных растений использовали гистохимический GUS-анализ. Срезы цельной ткани инкубировали с окрашивающим раствором GUS X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -глюкуронид) (1 миллиграмм/миллилитр) в течение соответствующего промежутка времени, промывали и визуально проверяли на синюю окраску. Активность GUS качественно определяли прямым визуальным осмотром или осмотром под микроскопом с использованием выбранных органов и тканей растения.

[00133] Для количественного анализа экспрессии GUS общий белок экстрагировали из отобранных тканей трансформированных растений сои. Один микрограмм общего белка использовали с флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-глюкуронидом (MUG) в общем реакционном объеме 50 микролитров. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцентен при высоком pH, где гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует pH для количественного определения флуоресцентного продукта. Флуоресценцию измеряли при возбуждении при 365 нм и излучении при 445 нм с использованием Fluoromax-3 с устройством считывания Micromax, с шириной щели установленной при возбуждении 2 нм и излучении 3 нм. Значения приведены в единицах нмоль GUS/час/мг общего белка.

[00134] Следующие ткани были отобраны для экспрессии GUS в поколении R<sub>0</sub>: корень стадии V5, лист (накопительная ткань) и лист (источник); корень стадии R1, лист (черешок), лист (источник) и цветки; семена стадии R3 (незрелые семена и стручок), семена стадии R5 (семядоли) и семена стадии R8 (зародыш и семядоли). В таблице 2 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированных тестируемыми группами регуляторных элементов EXP, где «Н/О» означает, что экспрессия в конкретной ткани не была определена.

**Таблица 2. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, обусловленная синтетическими группами регуляторных элементов и эндогенной EXP, EXP-At.Cyco:1:1.**

| Стадия развития | Орган                         | EXP-<br>At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38) | EXP-<br>At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) | EXP-<br>At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| V5              | Корень                        | 151                                | 399                                           | 928                                        |
|                 | Лист<br>(накопительная ткань) | 39                                 | 65                                            | 59                                         |
|                 | Лист<br>(источник)            | 52                                 | 109                                           | 100                                        |
| R1              | Корень                        | Н/О                                | 616                                           | 1893                                       |
|                 | Лист<br>(черешок)             | 97                                 | 470                                           | 136                                        |
|                 | Лист<br>(источник)            | 46                                 | 177                                           | 240                                        |
|                 | Цветы                         | 71                                 | 277                                           | 140                                        |
| R3              | Незрелые семена               | 64                                 | 477                                           | Н/О                                        |
|                 | Стручок                       | 84                                 | 575                                           | 702                                        |
| R5              | Семя<br>(семядоля)            | 91                                 | 564                                           | 58                                         |
| R8              | Семя<br>(зародыш)             | 57                                 | 149                                           | 301                                        |
|                 | Семя<br>(семядоля)            | 100                                | 1118                                          | 414                                        |

**[00135]** Как видно из таблицы 2, каждая из групп синтетических регуляторных элементов имеет уникальный паттерн экспрессии в образцах тканей по сравнению с эндогенной EXP. Например, синтетический промотор At.GSP442, P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), и лидер L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1), обеспечивают более высокие уровни экспрессии GUS во всех анализируемых органах по сравнению с эндогенной EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38), которая содержит идентичную последовательность интрона. Анализ TSS продемонстрировал согласованность TSS. Интрон был должным

образом вырезан в полученной мРНК, как и ожидалось. Кроме того, синтетический промотор At.GSP221, P-At.GSP221:3 (SEQ ID NO:31), и лидер, L-At.GSP221:1 (SEQ ID NO:32), EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30), также обеспечивают более высокие уровни конститутивной экспрессии в большинстве анализируемых органов по сравнению с эндогенной EXP-At.Cyco:1:1 и демонстрируют согласованную TSS. Однако TSS EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 не был расположен в предполагаемом месте - присутствовало несколько потенциальных элементов TATA. Это создает потенциальные проблемы для множества транскриптов, которые могут привести к множеству кодирующих последовательностей. Таким образом, EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 не считался приемлемым для использования при стимуляции экспрессии трансгена в стабильно трансформированных двудольных растениях. Это демонстрирует одну из сложностей в разработке синтетических элементов экспрессии. При разработке и идентификации синтетических экспрессирующих элементов был проведен анализ многих синтетических элементов, но только небольшое подмножество показывало желаемые характеристики и регуляторную активность, иллюстрируя сложность разработки эффективных синтетических транскрипционных регуляторных элементов.

[00136] Как видно из таблицы 2, синтетический промотор P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) и L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), содержащийся в EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1), способен стимулировать экспрессию конститутивного трансгена функционально связанного трансгена в стабильно трансформированном растении сои.

### **Пример 3.**

**Анализ синтетического промотора и лидера At.GSP571 и синтетических интронов At.GSI21 и At.GSI102, стимулирующих экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои**

[00137] Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения

анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп регуляторных элементов на экспрессию.

**[00138]** Растения сои трансформировали растительными конструкциями, экспрессирующими GUS, включающими синтетические EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7), EXP -At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8) и EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10). Каждая из синтетических EXP содержала синтетический промотор At.GSP571 (SEQ ID NO:5) и лидер (SEQ ID NO:6). EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 содержала эндогенный интрон *Arabidopsis*, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 и EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 содержали синтетические интроны I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) соответственно. Векторы бинарной трансформации растений были аналогичны описанным в примере 2, за исключением того, что каждый из векторов EXP At.GSP571 содержал 3'-нетранслируемую область T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34), полученную из гена *Sali3 Medicago truncatula*.

**[00139]** Количественный и качественный анализ экспрессии GUS проводили в соответствии с описанным в Примере 2. Образцы ткани, использованные для анализа, были такими же, как описано в Примере 2. В таблице 3 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулируемая тестируемыми синтетическими регуляторными элементами EXP, где «Н/О» означает, что экспрессия в конкретной ткани не была определена.

**Таблица 3. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулируемых синтетическими регуляторными элементами.**

| Стадия развития | Орган | EXP-<br>At.GSP<br>571<br>(SEQ<br>ID<br>NO:4) | EXP-<br>At.GSP571<br>.nno+At.C<br>yco:2<br>(SEQ ID<br>NO:7) | EXP-<br>At.GSP571<br>.nno+At.G<br>SI21.nno:<br>10 (SEQ<br>ID NO:8) | EXP-<br>At.GSP571<br>.nno+At.G<br>SI102.nno<br>:1 (SEQ<br>ID NO:10) |
|-----------------|-------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|-----------------|-------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|



|    |                               |      |      |      |      |
|----|-------------------------------|------|------|------|------|
| V5 | Корень                        | 40   | 57   | 165  | 579  |
|    | Лист<br>(накопительная ткань) | 650  | 612  | 792  | 1683 |
|    | Лист<br>(источник)            | 1379 | 1090 | 1475 | 2128 |
| R1 | Корень                        | 110  | N/O  | 457  | 645  |
|    | Лист<br>(черешок)             | 951  | 1091 | 1267 | 1167 |
|    | Лист<br>(источник)            | 1995 | 3538 | 2094 | 2129 |
|    | Цветы                         | 703  | 830  | 1408 | 350  |
| R3 | Незрелые семена               | 75   | 609  | 495  | 232  |
|    | Стручок                       | 852  | 2228 | 4014 | 1535 |
| R5 | Семя<br>(семядоля)            | 650  | 474  | 540  | 1433 |
| R8 | Семя<br>(зародыш)             | 1153 | 1004 | 603  | 1122 |
|    | Семя<br>(семядоля)            | 2449 | 4524 | 2533 | 2648 |

**[00140]** Как видно из таблицы 3, синтетический промотор и лидер At.GSP571 обеспечивают конститутивную экспрессию во всех анализируемых органах. Самая высокая экспрессия наблюдалась в листьях и семенах. Анализ TSS продемонстрировал согласованность TSS. Функциональное связывание последовательности интрона изменяло экспрессию во многих органах, обеспечивая средства для «точной настройки» конститутивной экспрессии. Различия в экспрессии наблюдали при функциональном связывании синтетических интронов I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Синтетические интроны усиливали экспрессию в некоторых тканях, но различались по уровню усиления для каждого органа. Например, усиление с использованием синтетического интрона I-At.GSI21.nno:2 в стручке R3 было выше, чем усиление, наблюдаемое с использованием синтетического интрона I-

At.GSI102.nno:1 и эндогенного интрона I-At.Сусо:2 относительно EXP-At.GSP571. Экспрессия была лишь незначительно усилена тремя функционально связанными интронами в черешке R1. У цветов R1 I-At.GSI21.nno:2 и I-At.Сусо:2 усиливали экспрессию, при этом I-At.GSI21.nno:2 обеспечивал высокий уровень усиления экспрессии, а I-At.Сусо:2 обеспечивал умеренный уровень усиления. Интересно, что I-At.GSI102.nno:1 снижал экспрессию в цветах R1.

[00141] Анализ полученных мРНК показал надлежащий и последовательный процесинг элементов интрона.

[00142] Синтетический промотор P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) и лидер L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6), содержащийся в EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), обеспечивают конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетическая EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.Сусо:2 (SEQ ID NO:7), которая включает в себя интрон *Arabidopsis* I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33) и EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8) и EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10), которые содержат синтетические интроны I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) соответственно, обеспечивают уникальные паттерны конститутивной экспрессии в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетические интроны, I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), обеспечивают усиленную или модулированную экспрессию во многих органах растения, когда они функционально связаны с EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4). Эти уникальные паттерны экспрессии можно использовать для стимуляции определенных трансгенов, в которых определенный паттерн экспрессии одной из четырех At.GSP571 EXP является наиболее желательным.

#### **Пример 4.**

**Анализ синтетического промотора и лидера At.GSP564 и синтетических интронов At.GSI17 и At.GSI102, стимулирующих экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои**

[00143] Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию

транспена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп регуляторных элементов на экспрессию.

**[00144]** Растения сои трансформировали растительными конструкциями, экспрессирующими GUS, содержащими синтетические EXP, EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12), EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:15), EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) и EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:18). Каждая из синтетических EXP содержал синтетический промотор P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13) и синтетический лидер L-At.GSP564.nno.1 (SEQ ID NO:14). EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 включает интрон *Arabidopsis*, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 и EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 содержали синтетические интроны I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) соответственно. Векторы бинарной трансформации растений были аналогичны описанным в примере 2, за исключением того, что каждый из векторов EXP At.GSP564 содержал 3'-нетранслируемую область T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO:35), полученную из предполагаемого гена белка оксидоредуктазы (OXR) из *Medicago truncatula*.

**[00145]** Количественный и качественный анализ экспрессии GUS проводили в соответствии с описанным в Примере 2. Образцы ткани, использованные для анализа, были такими же, как описано в Примере 2. В таблице 4 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулируемая тестируемыми синтетическими регуляторными элементами EXP, где «Н/О» означает, что экспрессия в конкретной ткани не была определена.

**Таблица 4. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулируемых синтетическими регуляторными элементами.**

| Стадия<br>развит<br>ия | Орган | EXP-<br>At.GSP564<br>(SEQ ID<br>NO:12) | EXP-<br>At.GSP564<br>.nno+At.C<br>yco:2 | EXP-<br>At.GSP56<br>4.nno+At<br>.GSI17.n | EXP-<br>At.GSP564<br>.nno+At.G<br>SI102.nno |
|------------------------|-------|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                        |       |                                        |                                         |                                          |                                             |

|    |                               |     | (SEQ ID<br>NO:15) | no:2<br>(SEQ ID<br>NO:16) | :1<br>(SEQ ID<br>NO:18) |
|----|-------------------------------|-----|-------------------|---------------------------|-------------------------|
| V5 | Корень                        | 61  | 108               | 54                        | 145                     |
|    | Лист<br>(накопительная ткань) | 38  | 220               | 89                        | 259                     |
|    | Лист<br>(источник)            | 74  | 421               | 209                       | 1229                    |
| R1 | Корень                        | 118 | 165               | 2348                      | 627                     |
|    | Лист<br>(черешок)             | 90  | 235               | 273                       | 148                     |
|    | Лист<br>(источник)            | 140 | 205               | 436                       | 917                     |
|    | Цветы                         | 66  | 91                | H/O                       | 305                     |
| R3 | Незрелые<br>семена            | 26  | H/O               | 101                       | H/O                     |
|    | Стручок                       | 40  | H/O               | 749                       | H/O                     |
| R5 | Семя<br>(семядоля)            | 25  | 88                | 78                        | 61                      |
| R8 | Семя<br>(зародыш)             | 38  | 97                | 137                       | 70                      |
|    | Семя<br>(семядоля)            | 79  | 288               | 655                       | 572                     |

**[00146]** Как видно из таблицы 4, синтетический промотор и лидер At.GSP564 обеспечивают конститутивную экспрессию во всех анализируемых органах. Самая высокая экспрессия наблюдалась в листьях и семенах. Анализ TSS продемонстрировал согласованность TSS. Функциональное связывание последовательности интрона изменяло экспрессию во многих органах, обеспечивая средства для «точной настройки» конститутивной экспрессии. Различия в экспрессии наблюдали при функциональном связывании синтетических интронов I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Синтетические интроны усиливали экспрессию в

некоторых тканях относительно EXP-At.GSP564, но различались по уровню усиления для каждого органа. Например, усиление с использованием синтетического интрона I-At.GSI102.nno:1 в источнике (лист) V5 было выше, чем усиление, наблюдаемое с использованием синтетического интрона I-At.GSI17.nno:1. В корне R1 усиление с использованием синтетического интрона I-At.GSI17.nno:1 было выше, чем усиление, обеспеченное синтетическим интроном I-At.GSI102.nno:1. Оба синтетических интрона обеспечивали большее усиление экспрессии в источнике (лист) R1, чем эндогенный интрон, I-At.Cyco:2.

**[00147]** Анализ полученных мРНК показал надлежащий и последовательный процесинг элементов интрона.

**[00148]** Синтетический промотор At.GSP564, P-At.GSP564.nno.3 (SEQ ID NO:13) и лидер, L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14), содержащий EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12), обеспечивает конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетическая EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:15), которая включает в себя интрон *Arabidopsis* I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) и EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) и EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:18), которые содержат синтетические интроны, I- At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) соответственно, обеспечивают уникальные паттерны конститутивной экспрессии в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетические интроны I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) обеспечивают усиленную или модулированную экспрессию трансгена во многих органах растений. когда они функционально связаны с EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Эти уникальные паттерны экспрессии можно использовать для стимуляции определенных трансгенов, в которых определенный паттерн экспрессии одной из четырех At.GS564 EXP является наиболее желательным.

#### **Пример 5.**

**Анализ** **синтетической** **EXP,** **EXP-**  
**At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3, стимулирующей экспрессию GUS в**  
**стабильно трансформированных растениях сои**

**[00149]** Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группу синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

**[00150]** Растения сои трансформировали растительной конструкцией, экспрессирующей GUS, содержащей синтетическую EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22). EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 содержит EXP-At.GSP579 (SEQ ID NO:19), состоящая из промотора и лидера At.GSP (SEQ ID NO:20 и 21 соответственно), функционально связана 5' с синтетическим интроном, I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Трансгенная кассета GUS также содержит 3'-нетранслируемую область, T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO:37), полученную из чувствительного к дегидратации гена белка RD22 из *Medicago truncatula*.

**[00151]** Количественный и качественный анализ экспрессии GUS проводили в соответствии с описанным в Примере 2. Образцы ткани, использованные для анализа, были такими же, как описано в Примере 2. В таблице 5 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированная синтетической EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3, где «Н/О» означает, что экспрессия в конкретной ткани не была определена,

**Таблица 5. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3.**

| Стадия развития | Орган                         | EXP-<br>At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3<br>(SEQ ID NO:22) |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|
| V5              | Корень                        | 187                                                     |
|                 | Лист<br>(накопительная ткань) | 311                                                     |
|                 | Лист (источник)               | 458                                                     |
| R1              | Корень                        | 148                                                     |
|                 | Лист (черешок)                | 118                                                     |
|                 | Лист (источник)               | 425                                                     |
|                 | Цветы                         | 130                                                     |
| R3              | Незрелые семена               | Н/О                                                     |
|                 | Стручок                       | Н/О                                                     |
| R5              | Семя (семядоля)               | Н/О                                                     |
| R8              | Семя (зародыш)                | 127                                                     |
|                 | Семя (семядоля)               | 266                                                     |

[00152] Как видно из таблицы 5, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22) обеспечивает конститутивную экспрессию в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетический промотор P-At.GSP579.nno:2 (SEQ ID NO:20) и лидер L-At.GSP579.nno:1 (SEQ ID NO:21), содержащиеся в EXP-At.GSP579 (SEQ ID NO:19), приводят к конститутивной экспрессии функционально связанного трансгена. Как можно было вывести на основании предыдущих примеров, в которых синтетический интрон I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) был функционально связан с другими конститутивными синтетическими промоторами; I-At.GSI102.nno:1 усиливает или модулирует конститутивную экспрессию, обусловленную EXP-At.GSP579, по меньшей мере в некоторых из выбранных органов.

#### Пример 6.

**Анализ синтетической EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.Сусо:2, стимуляция экспрессии GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника**

[00153] Растения хлопчатника трансформировали вектором, в

частности, вектором экспрессии растений, содержащим группу синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

**[00154]** Растительный бинарный вектор, содержащий синтетическую EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7), аналогичную описанной в примере 3, использовали для стабильной трансформации растений хлопчатника. Трансгенная кассета GUS содержала EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2, функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42), содержащей перерабатываемый интрон, полученный из светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный 5' с 3'-нетранслируемой областью из гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36). Полученные в результате трансформированные хлопчатниковые объекты выращивали и образцы ткани получали из листа 4 узла, черешка 8 узла, черешка, листа (источника) и листа (накопительная ткань); квадратных прицветников и квадратных бутонов до оплодотворения; пыльника и завязи во время цветения, а также стенки семенной коробочки через 8 дней после опыления (DAP) для качественной и количественной экспрессии GUS.

**[00155]** В таблице 6 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированная синтетической EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2.

**Таблица 6. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника, стимулированная EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2.**



| Стадия              | Орган                     | Среднее значение |
|---------------------|---------------------------|------------------|
| 4 узел -            | лист                      | 1232,57          |
| 8 узел -            | лист, черешок             | 223,68           |
|                     | Лист, накопительная ткань | 612,14           |
|                     | Лист, источник            | 618,9            |
| До оплодотворения - | квадратные прицветники    | 381,69           |
|                     | квадратные бутоны         | 347,22           |
| Цветение,           | пыльник                   | 64,66            |
|                     | Цветение, завязь          | 210,92           |
| 8DAP                | Стенка семенной коробочки | 835,94           |

**[00156]** Как видно из таблицы 6, EXP-At.GSP571.nno+At.Сусо:2 экспрессируется во всех отобранных тканях. Наивысшая экспрессия наблюдалась в листе 4 узла, а наименьшая - в пыльнике во время цветения. Экспрессия в источнике и накопительной ткани листьев 8 узла была относительно одинаковой и примерно вдвое меньше, чем в листьях 4 узла. Экспрессия в стенках семенной коробочки также была высокой. Таблица 6 демонстрирует, что промотор, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), способен управлять конститутивной экспрессией в стабильно трансформированных растениях хлопчатника. Интрон I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33) в EXP-At.GSP571.nno+At.Сусо:2 усиливает экспрессию промотора P-At.GSP571.nno:5 в стабильно трансформированных растениях сои, как показано в Примере 3.

#### **Пример 7.**

**Анализ синтетического химерного промотора P-At.GSP571/442, стимулирующего экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои**

**[00157]** Растения сои трансформировали векторами, в частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию

трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

**[00158]** Растения сои трансформировали растительным бинарным вектором, содержащим синтетическую EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1 (SEQ ID NO:23), которая состоит из синтетического химерного промотора P -At.GSP571/442 (SEQ ID NO:25), содержащего синтетический энхансер E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24), полученный из синтетического промотора P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), который функционально связан 5' с синтетическим промотором P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) и функционально связан 5' с синтетическим лидером, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), функционально связанным 5' с лидером, L-At.Сусо-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Сусо: 2 (SEQ ID NO:33). Трансгенная кассета GUS содержала EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1, функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ес.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42), содержащей перерабатываемый интрон, полученный из светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный 5' с синтетической 3'-нетранслируемой областью T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29).

**[00159]** Был также создан растительный бинарный вектор, используемый для сравнения активности химерного промотора. Вектор содержит EXP, EXP-At.GSP442+L-I-At.Сусо (SEQ ID NO:43), состоящий из синтетического промотора P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), функционально связанного 5' с синтетическим лидером, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), функционально связанным 5' с лидером, L-At.Сусо-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33). Бинарные векторы аналогичны описанным в примерах 2-6, за исключением того, что каждая трансгенная кассета GUS имеет синтетическую 3'-нетранслируемую область T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29),

функционально связанную 3' с кодирующей GUS последовательностью.

[00160] Растения сои трансформировали двумя бинарными векторами. Образцы тканей были взяты из выбранных органов на определенных стадиях развития и проанализированы для оценки качественной и количественной экспрессии GUS. В таблице 7 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированных синтетическими EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 и EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco.

**Таблица 7. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 и EXP-At.GSP442+LI-At.Cyco.**

|        |                           | EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco (SEQ ID NO:43) | EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23) |
|--------|---------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Стадия | Орган                     | Среднее значение                         | Среднее значение                                         |
| V5     | Лист, накопительная ткань | 69,61                                    | 72,12                                                    |
|        | Лист, источник            | 88,22                                    | 96,06                                                    |
|        | Корень                    | 74,67                                    | 102,9                                                    |
| R1     | Цветы                     | 79,16                                    | 62,01                                                    |
|        | лист, черешок             | 77,07                                    | 87                                                       |
|        | Лист, источник            | 66,59                                    | 114,33                                                   |
|        | Корень                    | 76,88                                    | 123,12                                                   |
| R3     | Стручок                   | 93,19                                    | 102,54                                                   |
|        | Семя, незрелое            | 71,15                                    | 61,62                                                    |
| R5     | Семя, семядоля            | 78,72                                    | 92,83                                                    |

|    |                   |        |        |
|----|-------------------|--------|--------|
| R8 | Семя,<br>семядоля | 65,55  | 72,15  |
|    | Семя, зародыш     | 129,95 | 107,66 |

[00161] Как видно из таблицы 7, добавление синтетического энхансера E-At.GSP571.nno:1 усиливает экспрессию во многих отобранных тканях. Обе EXP обеспечивали конститутивную экспрессию в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST59.nno:1 функционировала аналогично естественной 3'-нетранслируемой области в обеспечении надлежащей терминации и полиаденилирования транскрипта.

#### Пример 8.

**Анализ синтетического химерного промотора P-At.GSP571/442, стимулирующего экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника**

[00162] Растения хлопчатника трансформировали вектором, в частности, вектором экспрессии растений, содержащим группу синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

[00163] Растения хлопчатника трансформировали растительным бинарным вектором, содержащим синтетическую EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1 (SEQ ID NO:23), которая состоит из синтетического химерного промотора P -At.GSP571/442 (SEQ ID NO:25), содержащего синтетический энхансер E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24), полученный из синтетического промотора P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), который функционально связан 5' с синтетическим промотором P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) и функционально связан 5' с синтетическим лидером, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), функционально связанным 5' с лидером, L-At.Сусо-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Сусо: 2 (SEQ ID NO:33). Трансгенная кассета GUS содержала EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1,

функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42), содержащей перерабатываемый интрон, полученный из светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный 5' с синтетической 3'-нетранслируемой областью T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29). Полученные в результате трансформированные хлопчатниковые объекты выращивали и образцы ткани получали из листа 4 узла, черешка 8 узла, черешка, листа (источника) и листа (накопительная ткань); квадратных прицветников и квадратных бутонов до оплодотворения; пыльника и завязи во время цветения, а также стенки семенной коробочки через 8 дней после опыления (DAP) для качественной и количественной экспрессии GUS.

[00164] В таблице 8 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированная синтетической EXP, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1, где «нпо» означает ниже предела обнаружения.

**Таблица 8. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника, стимулированная EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1.**

| Стадия              | Орган                     | Среднее значение |
|---------------------|---------------------------|------------------|
| 4 узел -            | лист                      | 177,74           |
| 8 узел -            | лист, черешок             | нпо              |
|                     | Лист, накопительная ткань | 108,39           |
|                     | Лист, источник            | 294,99           |
| До оплодотворения - | квадратные прицветники    | 78,84            |
|                     | квадратные бутоны         | 118,21           |
| Цветение,           | пыльник                   | 69,19            |
|                     | Цветение, завязь          | 69,78            |
| 8DAP                | Стенка семенной           | 159,58           |

|                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                         | коробочки                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>[00165]</b>                                                                                                                          | Как видно из таблицы 8,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Сусо:1 (SEQ ID NO:23) была способна стимулировать конститутивную экспрессию GUS в отобранных тканях. Экспрессия в черешке была определена ниже предела обнаружения. Наивысшая экспрессия проявлялась в листе (источник) 8 узла. Экспрессия была относительно равной в пыльнике и завязи во время цветения. Кроме того, синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29) функционировала аналогично естественной 3'-нетранслируемой области в обеспечении надлежащей терминации и полиаденилирования транскрипта. |
| <b>Пример 9.</b>                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Анализ синтетической EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1, стимулирующей экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>[00166]</b>                                                                                                                          | Растения сои трансформировали вектором, в частности, вектором экспрессии растений, содержащим группу синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>[00167]</b>                                                                                                                          | Растения сои трансформировали растительным бинарным вектором, содержащим синтетическую EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1 (SEQ ID NO:45). Трансгенная кассета GUS также содержала 3'-нетранслируемую область гена <i>FbLate-2 Gossypium barbadense</i> (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36), функционально связанную 3' с кодирующей последовательностью GUS. Полученные трансформированные события сои были выращены, и образцы ткани выбранных органов на нескольких стадиях развития были отобраны и проанализированы для оценки качественной и количественной экспрессии GUS. Экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1, представлена в таблице 9. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

**Таблица 9. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1.**

| Стадия развития | Орган                      | Среднее значение |
|-----------------|----------------------------|------------------|
| V5              | Корень                     | 60,95            |
|                 | Лист (накопительная ткань) | 97,43            |
|                 | Лист (источник)            | 181,64           |
| R1              | Корень                     | 82,4             |
|                 | Лист (черешок)             | 208,28           |
|                 | Лист (источник)            | 214              |
|                 | Цветы                      | 123,37           |
| R3              | Незрелые семена            | 95,29            |
|                 | Стручок                    | 158,24           |
| R5              | Семя (семядоля)            | 85,97            |
| R8              | Семя (зародыш)             | 67,4             |
|                 | Семя (семядоля)            | 52,92            |

**[00168]** Как видно из таблицы 9, EXP-At.GSP576.nno+At.Сусо:1 (SEQ ID NO:45) обеспечивает конститутивную экспрессию в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетический промотор P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) и лидер L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) стимулируют конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена. Как можно было вывести на основании предыдущих примеров, в которых интрон I-At.Сусо:2 (SEQ ID NO:33), был функционально связан с другими конститутивными синтетическими промоторами, I-At.Сусо:2 усиливает или модулирует конститутивную экспрессию, обусловленную P-At.GSP576.nno:4, по меньшей мере в некоторых из выбранных органов.

#### **Пример 10.**

**Анализ синтетической EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, стимулирующей экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои**

**[00169]** Растения сои трансформируют векторами, в частности,

растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализируют на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп регуляторных элементов на экспрессию.

[00170] Растения сои трансформируют растительными бинарными векторами, содержащими либо синтетическую EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO:26), либо EXP, EXP-At.Сусо:1:1 (SEQ ID NO:38). Трансгенные кассеты GUS также содержат 3'-нетранслируемую область гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36), функционально связанную 3' с кодирующей последовательностью GUS. Полученные трансформированные события сои были выращивают, и образцы ткани выбранных органов на нескольких стадиях развития отбирают и анализируют для оценки качественной и количественной экспрессии GUS. Экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, сравнивается с экспрессией, стимулированной EXP-At.Сусо:1:1. Экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои, стимулированная EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, демонстрирует способность синтетического промотора P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) и лидера L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) управлять конститутивной экспрессией функционально связанного трансгена.

[00171] Как показано в примерах 9 и 11, синтетический промотор P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) и лидер L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) стимулируют конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена. Как было показано в примере 4, синтетический интрон I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) усиливал или модулировал экспрессию трансгена во многих органах растения, когда он был функционально связан с EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Аналогичным образом можно разумно ожидать, что экспрессия синтетического промотора P-At.GSP576.nno:4 и лидера L-At.GSP576.nno:2 будет усилена или модулирована аналогичным образом.

**Пример 11.**



**Анализ синтетической EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, стимулирующей экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника**

[00172] Растения хлопчатника трансформировали вектором, в частности, вектором экспрессии растений, содержащим группу синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию транскена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

[00173] Растения хлопчатника трансформировали бинарным вектором, содержащим синтетическую EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO:26), как описано ранее в Примере 10. Трансгенные кассеты GUS также содержали 3'-нетранслируемую область гена FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36), функционально связанную 3' с кодирующей последовательностью GUS. Полученные в результате трансформированные хлопчатниковые объекты выращивали и образцы ткани получали из листа 4 узла, черешка 8 узла, черешка, листа (источника) и листа (накопительная ткань); квадратных прицветников и квадратных бутонов до оплодотворения; пыльника и завязи во время цветения, а также стенки семенной коробочки через 8 дней после опыления (DAP) для качественной и количественной экспрессии GUS.

[00174] В таблице 10 показана средняя количественная экспрессия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированная синтетической EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3.

**Таблица 10. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника, стимулированная EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3.**

| Стадия              | Орган                     | Среднее значение |
|---------------------|---------------------------|------------------|
| 4 узел -            | лист                      | 579,03           |
| 8 узел -            | лист, черешок             | 301,57           |
|                     | Лист, накопительная ткань | 159,4            |
|                     | Лист, источник            | 577,11           |
| До оплодотворения - | квадратные прицветники    | 262,66           |
|                     | квадратные бутоны         | 223,59           |
| Цветение,           | пыльник                   | 171,2            |
|                     | Цветение, завязь          | 109              |
| 8DAP                | Стенка семенной коробочки | 433,64           |

[00175] Как видно из таблицы 10, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO: 26) управляла конститутивной экспрессией трансгена GUS в стабильно трансформированных растениях хлопчатника. Наивысшая экспрессия наблюдалась в листе 4 узла, листа (источник) 8 узла и стенке семенной коробочки на 8 DAP. Синтетический промотор P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) и лидер L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) способны стимулировать конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена в стабильно трансформированных растениях хлопчатника. Как было показано в примере 4, синтетический интрон I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) усиливал или модулировал экспрессию трансгена во многих органах растения, когда он был функционально связан с EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Аналогичным образом можно разумно ожидать, что экспрессия синтетического промотора P-At.GSP576.nno:4 и лидера L-At.GSP576.nno:2 будет усилена или модулирована аналогичным образом в стабильно трансформированных растениях хлопчатника.

#### Пример 12.

#### Энхансерные элементы, полученные из регуляторного элемента

[00176] Энхансеры получены из промоторных элементов,

представленных в виде SEQ ID NOs: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39. Энхансерный элемент может состоять из одного или нескольких *цис*-регуляторных элементов, которые, когда они функционально связаны 5' или 3' с элементом промотора или функционально связаны 5' или 3' с дополнительными элементами энхансера, которые функционально связаны с промотором, могут усиливать или модулировать уровни экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК или обеспечивать экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК в конкретном типе клеток или в растительном органе или в конкретный момент времени развития или циркадного ритма. Энхансеры получают путем удаления ТАТА-блока или функционально аналогичных элементов и любой последовательности из промоторов далее по ходу транскрипции, которая позволяет инициировать транскрипцию с промоторов, представленных в виде SEQ ID NO: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39 или их фрагментов. Например, синтетический энхансер E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24) был получен из синтетического промотора P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) и состоит из нуклеотидов с 1 по 422 из P-At.GSP571.nno:5, исключая последовательность по ходу транскрипции от 3', которая также содержит ТАТА-бокс синтетического промотора.

[00177] Может потребоваться дальнейшее уточнение элемента энхансера, и оно подтверждено эмпирически. Кроме того, положение элемента энхансера относительно других элементов в группе химерных регуляторных элементов также определяется эмпирически, поскольку порядок каждого элемента в группе химерных регуляторных элементов может оказывать различное влияние в зависимости от относительных положений каждого элемента. Некоторые промоторные элементы будут иметь несколько элементов ТАТА-бокс или элементов, подобных элементам ТАТА-бокс и потенциально несколько начальных сайтов транскрипции. При таких обстоятельствах может возникнуть необходимость сначала определить, где находится первый TSS, а затем начать разработку энхансеров с использованием первого TSS, чтобы предотвратить возможную инициацию транскрипции в предполагаемом энхансерном элементе.

[00178] Энхансерные элементы, полученные из синтетических

промоторных элементов, представленных в виде SEQ ID NOs: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39, клонируются с использованием способов, известных в данной области техники, для функционального связывания 5' или 3' с элементом промотора или функционального связывания 5' или 3' с дополнительными энхансерными элементами, функционально связанными с промотором. Альтернативно, энхансерные элементы могут быть клонированы с использованием способов, известных в данной области техники, для обеспечения большего энхансерного элемента, который состоит из двух или более копий энхансера и клонирован с использованием способов, известных в данной области техники, для функционального связывания 5' или 3' с промоторным элементом или функционального связывания 5' или 3' с дополнительными энхансерными элементами, которые функционально связаны с промотором, продуцирующим химерный транскрипционный регуляторный элемент. Энхансерные элементы также могут быть клонированы с использованием способов, известных в данной области техники, для функционального связывания 5' с промоторным элементом, полученным из организма другого рода, или для функционального связывания 5' или 3' с дополнительными энхансерными элементами, полученными из организмов другого рода, которые функционально связаны с промотором, полученным из организма того же или другого рода, что приводит к созданию химерного регуляторного элемента.. Вектор трансформации растения для экспрессии GUS может быть сконструирован с использованием способов, известных в данной области, аналогично конструкциям, описанным в примере 2, в которых полученные векторы экспрессии растения содержат правую граничную область из *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.right border), первую кассету для отбора трансгенов, используемую для отбора трансформированных растительных клеток, которые придают устойчивость к антибиотику спектиномицину; вторую кассету трансгена для тестирования энхансерного элемента, состоящего из энхансерного элемента, функционально связанного 5' или 3' с элементом промотора или функционально связанного 5' или 3' с дополнительными энхансерными элементами, которые, в свою очередь, функционально связаны с промотором, который

функционально связан 5' с лидерным элементом, функционально связанным с кодирующей последовательностью для  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42), содержащей обрабатываемый интрон, полученный из светоиндуцируемого тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный с 3'-областью терминации и левую граничную область от *A. tumefaciens* (B-AGRtu.left border). Полученные плазмиды используют для трансформации растений сои или растений другого рода способами, описанными в примерах. Альтернативно, клетки протопласта, полученные из растений сои или других родов, трансформируют с использованием способов, известных в данной области, для проведения анализов транзientной экспрессии.

**[00179]** Экспрессия GUS, стимулированная регуляторным элементом, содержащим один или несколько энхансеров, оценивается выполнением анализов стабильной или транзientной экспрессии у растений, чтобы определить влияние энхансерного элемента на экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК. Модификации одного или нескольких энхансерных элементов или дублирование одного или нескольких энхансерных элементов могут быть выполнены на основе эмпирических экспериментов и полученной в результате регуляции экспрессии генов, которая наблюдается с использованием каждой композиции регуляторных элементов. Изменение относительных положений одного или нескольких энхансеров в полученных в результате регуляторных или химерных регуляторных элементах может влиять на транскрипционную активность или специфичность регуляторного или химерного регуляторного элемента и определяется эмпирически для выявления наилучших энхансеров для желаемого профиля экспрессии трансгена в растении сои или растения другого рода.

#### **Пример 13.**

**Анализ влияния на экспрессию GUS, вызванного синтетической 3'-нетранслируемой областью, T-Zm.GST7.pno:2, в стабильно трансформированных растениях сои**

**[00180]** Растения сои трансформировали вектором, в

частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных регуляторных элементов на экспрессию.

[00181] Растения сои трансформировали двумя бинарными векторами, содержащими EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), управляющими экспрессией GUS. Трансгенные кассеты GUS также содержали либо эндогенную 3'-нетранслируемую область T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34), либо синтетическую 3'-нетранслируемую область T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID №: 44). Экспрессию белка GUS количественно измеряли в органах стабильно трансформированных растений сои, трансформированных двумя конструкциями. Экспрессию GUS сравнивали между конструкциями. В приведенной ниже таблице 11 показана средняя экспрессия GUS, модулированная синтетической 3'-нетранслируемой областью T-Zm.GST7.nno:2, относительно таковой, модулированной эндогенной 3'-нетранслируемой областью T-Mt.Sali3-2-1:2:1, где «Н/О» означает «не определено», а «нпо» означает «ниже предела обнаружения».

**Таблица 11. Средняя количественная экспрессия GUS в стабильно трансформированных растениях сои.**

| Стадия развития | Орган                      | T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34) | T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) | Ослабление (раз) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------|
| V5              | Корень                     | 40                                | нпо                            |                  |
|                 | Лист (накопительная ткань) | 650                               | 88                             | 7,4              |
|                 | Лист (источник)            | 1379                              | 278                            | 5,0              |
| R1              | Корень                     | 110                               | 72                             | 1,5              |
|                 | Лист (черешок)             | 951                               | 199                            | 4,8              |
|                 | Лист (источник)            | 1995                              | 642                            | 3,1              |
|                 | Цветы                      | 703                               | 139                            | 5,1              |

|    |                 |      |     |     |
|----|-----------------|------|-----|-----|
| R3 | Незрелые семена | 75   | нпо |     |
|    | Стручок         | 852  | 386 | 2,2 |
| R5 | Семя (семядоля) | 650  | 174 | 3,7 |
| R8 | Семя (зародыш)  | 1153 | Н/О |     |
|    | Семя (семядоля) | 2449 | Н/О |     |

**[00182]** Как видно из Таблицы 11, синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST7.nno:2 ослабляла экспрессию относительно 3'-нетранслируемой области, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 во всех проанализированных тканях. Степень ослабления варьировала для каждой ткани от 1,5 раза в корнях R1 до 7,4 раза в листе (источник) V5. Использование 3'-нетранслируемой области для ослабления экспрессии в стабильно трансформированных растениях имеет широкое применение. Например, 3'-нетранслируемая область может использоваться в сочетании с другими регуляторными элементами, такими как промоторы, лидеры и интроны, для точной настройки экспрессии трансгена, особенно в случаях, когда высокая экспрессия может привести к не фенотипическим эффектам, которые вредны для трансформированного растения. Анализ полученного транскрипта GUS подтвердил надлежащую терминацию транскрипта, обусловленную синтетической 3'-нетранслируемой областью T-Zm.GST7.nno:2. Синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST7.nno:2 способна модулировать экспрессию и обеспечивать надлежащую терминацию транскрипции в стабильно трансформированных растениях сои.

#### **Пример 14.**

**Анализ синтетических 3'-нетранслируемых областей T-Zm.GST7.nno:2 и T-Zm.GST59.nno:1 в отношении экспрессии GUS в протопластах кукурузы**

**[00183]** Протопласты листьев кукурузы трансформировали векторами, в частности, векторами экспрессии, содержащими тестируемые регуляторные элементы, стимулирующие экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные в результате трансформированные протопласты листьев кукурузы анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных регуляторных

элементов на экспрессию.

**[00184]** Протопласты кукурузы, полученные из ткани листьев, трансформировали векторами экспрессии, содержащими синтетические элементы экспрессии, и сравнивали с элементами экспрессии, известными в данной области. Два вектора экспрессии были сконструированы для оценки активности синтетических 3'-нетранслируемых областей: T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) и T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29). Также были сконструированы два сконструированных вектора экспрессии. Каждая из четырех конструкций содержала трансгенную кассету, содержащую конститутивный промотор и лидер EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO:46), функционально связанный 5' с интроном I-Zm.DnaK: 1 (SEQ ID NO:47), функционально связанным 5' с кодирующей последовательностью GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1 (SEQ ID NO:42). Векторы экспрессии, используемые для оценки синтетической 3'-нетранслируемой области, содержали либо T-Zm.GST7.nno:2, либо T-Zm.GST59.nno:1, функционально связанный 3' с кодирующей последовательностью GUS. Один контрольный вектор содержал 3'-нетранслируемую область T-Os.LTP: 1 (SEQ ID NO:48), функционально связанную 3' с кодирующей последовательностью GUS. У другого контрольного вектора отсутствовала 3'-нетранслируемая область.

**[00185]** Плазмиду, используемую для совместной трансформации протопластов и нормализации данных, также конструировали с использованием способов, известных в данной области. Она содержала трансгенную кассету, состоящую из EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO:46), функционально связанной 5' с кодирующей последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок люциферазы NanoLuc<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI 53711), Nluc (SEQ ID NO:49), который был функционально связан 5' с 3'-нетранслируемой областью T-Os.LTP: 1 (SEQ ID NO:48).

**[00186]** Протопласты листьев кукурузы трансформировали с использованием метода трансформации на основе ПЭГ, аналогичного известным в данной области. Клетки протопласта трансформировали на планшете с использованием девяти до шести лунок. Двенадцать



микрограммов ДНК тестируемого вектора или ДНК контрольного вектора и шесть микрограммов ДНК вектора NanoLuc<sup>®</sup> использовали для трансформации  $3,2 \times 10^5$  протопластов на лунку. После трансформации протопласты инкубировали при 25°C в темноте в течение от шестнадцати до двадцати часов. После инкубации протопласты лизировали и лизат использовали для измерения экспрессии GUS и люциферазы. Для лизиса клеток клетки в планшете осаждали центрифугированием, промывали, ресуспендировали в меньшем объеме и переносили в специализированные пробирки в стрипах. Пробирки снова центрифугировали и супернатант аспирировали, оставляя осадок протопластных клеток. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере QB (100 мМ KPO<sub>4</sub>, pH 7,8; 1 мМ ЭДТА; 1% Triton X-100; 10% глицерин; 1 мМ DTT). Клетки лизировали путем энергичного пипетирования клеток несколько раз, встряхивали на вортексе и оставляли пробирки для инкубации на льду в течение пяти минут. Затем лизат центрифугировали для осаждения клеточного дебриса. Полученный лизат затем переносили на чистую пластину.

**[00187]** Активность люциферазы оценивали с использованием субстрата для анализа люциферазы Nano-Glo<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI 53711) в буфере QB. Вкратце, небольшой объем лизата, буфера QB и раствора субстрата для анализа люциферазы Nano-Glo<sup>®</sup> в QB смешивали вместе в белых планшетах на девяносто шесть лунок. Флуоресценцию затем измеряли с использованием считывателя для планшетов PHERAstar<sup>®</sup> (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513).

**[00188]** Активность GUS анализировали с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронида (MUG) в общем реакционном объеме 50 микролитров. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцентен при высоком pH, где гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует pH для количественного определения флуоресцентного продукта. Аликвоту лизата смешивали с аликвотой MUG, растворенной в буфере QB, и инкубировали при 37 °C. Небольшую аликвоту реакционной смеси лизат/MUG удаляли и добавляли в стоп-

буфер в три разных момента времени: (1) сразу после смешивания реакционной смеси лизат/MUG (время определено как «время ноль минут»); (2) через двадцать минут и (3) через шестьдесят минут. Флуоресценцию измеряли при возбуждении при 355 нм, излучении при 460 нм с использованием считывателя для планшетов PHERAstar® (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513).

**[00189]** Для процесса трансформации использовали по меньшей мере два планшета, для каждого вектора экспрессии проводили от четырех до восьми трансформаций на один планшет. На каждом планшете трансформацию каждой конструкции проводили в четырех или восьми лунках. Аликвоту отбирали из каждой трансформации для анализа MUG, а показатель «гидролизированный MUG, нМ» брали на основании стандартной кривой для планшета. Также брали аликвоту каждой трансформации для считывания с помощью NanoLuc® (NanoLuc® RLU). Среднее значение гидролизованного MUG (нМ)/NanoLuc® RLU для каждого вектора экспрессии нормировали к вектору экспрессии EXP-CaMV.35S/I-Zm.DnaK: 1/T-Os.LTP:1, установленное значение для которого составляло 100%. В таблице 12 показано усредненное значение средних значений для всех используемых при трансформации лунок для каждого вектора экспрессии, содержащего синтетические 3'-нетранслируемые области T-Zm.GST7.nno:2 и T-Zm.GST59.nno:1, и для контролей.

**Таблица 12. Усредненное значение средних значений гидролизованного MUG (нМ)/NanoLuc® RLU для каждого вектора экспрессии.**

| 3'-нетранслируемая область     | Усредненное значение средних значений | Stderr |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------|
| T-Os.LTP:1                     | 100,00                                | 8,09   |
| Нет 3'-нетранслируемой области | 51,95                                 | 4,71   |
| T-Zm.GST59.nno:1               | 505,45                                | 37,75  |
| T-Zm.GST7.nno:2                | 345,31                                | 40,73  |

**[00190]** Как видно из таблицы 12, вектор экспрессии без 3'-нетранслируемой области обеспечивал меньшую экспрессию, чем контроль T-Os.LTP:1. Экспрессия усиливалась синтетическими 3'-

нетранслируемые областями T-Zm.GST7.nno:2 и T-Zm.GST59.nno:1 по сравнению с контролем T-Os.LTP:1. Анализ транскриптов показал надлежащую терминацию, обусловленную синтетическими 3'-нетранслируемыми областями T-Zm.GST7.nno:2 и T-Zm.GST59.nno:1. Синтетические 3'-нетранслируемые области T-Zm.GST7.nno:2 и T-Zm.GST59.nno:1 способны модулировать экспрессию и обеспечивать надлежащую терминацию транскрипции трансформированных протопластах листьев кукурузы.

#### **Пример 15.**

#### **Анализ регуляторных элементов, стимулирующих GUS в протопластах листьев хлопчатника**

[00191] Протопласты листьев хлопчатника трансформировали векторами, в частности векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученные трансформированные протопласты листьев хлопчатника анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранных групп регуляторных элементов на экспрессию.

[00192] Протопласты хлопчатника, полученные из ткани листьев, трансформировали векторами экспрессии, содержащими синтетические элементы экспрессии, и сравнивали с элементами экспрессии, известными в данной области. Отдельные эксперименты проводили для оценки активности EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10), EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) и EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22). Элементы экспрессии были клонированы в векторы экспрессии и функционально связаны с кодирующей последовательностью GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1 (SEQ ID NO:42), которая содержала обрабатываемый интрон. Контрольные векторы экспрессии содержали различные конфигурации известных элементов экспрессии.

[00193] Две плазмиды, предназначенные для совместной трансформации и нормализации данных, также конструировали с использованием методов, известных в данной области. Каждая

плазмида содержала специфическую кодирующую последовательность люциферазы, которая была стимулирована конститутивной последовательностью EXP. Растительный вектор pFLUC содержал трансгенную кассету с конститутивным промотором, функционально связанным 5' с интроном, (EXP-CaMV.35S-Enh+Zm.DnaK: 1:1, SEQ ID NO: 53), функционально связанным 5' с последовательностью, кодирующей люциферазу светлячка (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID NO: 54), функционально связанной 5' с 3'-нетранслируемой областью из гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 55). Растительный вектор pRLUC содержал трансгенную кассету с конститутивной последовательностью EXP (EXP-CaMV.35S-Enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 56), функционально связанную 5' с последовательностью, кодирующей люциферазу *Renilla reniformis* (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 57), функционально связанной 5' с 3'-нетранслируемой областью из гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 55).

[00194] Протопласты листьев хлопчатника трансформировали с использованием метода трансформации на основе ПЭГ, известного в данной области. Протопласты трансформировали плазмидами, pFLUC и pRLUC и эквимоллярным количеством экспрессирующих EXP векторов. Измерения GUS и люциферазы проводили путем помещения аликвот лизированного препарата клеток, трансформированных в соответствии с описанием выше, в два разных планшета с неглубокими лунками. Один планшет использовали для измерений GUS, а второй - для проведения анализа Dual-Luciferase с использованием системы анализа репортерного гена люциферазы Dual-Luciferase (Promega Corp., Madison, WI; см., например, Promega Notes Magazine, №: 57, 1996, стр. 02). Измерения образца были основаны на множественных трансформациях, аналогичных представленным в Примере 14. Средние значения GUS/FLUC рассчитывали аналогично примеру 14, но не нормировали к контрольным векторам EXP.

[00195] Последовательности EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8) и EXP-At.GSP571.nno+At. GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10) клонировали в

векторы экспрессии растений, функционально связанные 5' с кодирующей последовательностью GUS (SEQ ID NO:42), функционально связанной 5' с 3'-нетранслируемой областью T-Mt.Sali3 -2-1:2:1 (SEQ ID NO:34). Два вектора экспрессии контрольного растения были сконструированы с использованием последовательности EXP, EXP-At.Bglu21+At.Сусо: 2 (SEQ ID NO: 50), о которой известно, что она плохо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника, и последовательности EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), которая хорошо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника. Контрольные последовательности EXP были функционально связаны с одной и той же последовательностью 3'-нетранслируемой области и GUS. Кроме того, растительный экспрессионный вектор, содержащий трансгенную кассету GUS, содержащую EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), функционально связанную с GUS, содержит синтетическую 3'-нетранслируемую область, T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) для оценки активности синтетической 3'-нетранслируемой области. Средние значения GUS/FLUC для нескольких трансформаций представлены в таблице 13.

**Таблица 13. Средние значения GUS/FLUC для трансформированных протопластов листьев хлопчатника**

| EXP                                       | EXP<br>SEQ ID<br>NO: | 3'-<br>нетранслируе<br>мая область | 3'-<br>нетранслируе<br>мая область,<br>SEQ ID NO: | Среднее<br>значение<br>GUS/FLUC |
|-------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|
| EXP-<br>At.Bglu21+At.Сусо:2               | 50                   | T-Mt.Sali3-<br>2-1:2:1             | 34                                                | 0,09                            |
| EXP-CaMV.35S-<br>enh+Ph.DnaK:1:3          | 51                   | T-Mt.Sali3-<br>2-1:2:1             | 34                                                | 1,70                            |
| EXP-At.GSP571                             | 4                    | T-Mt.Sali3-<br>2-1:2:1             | 34                                                | 0,56                            |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.GS<br>I21.nno:10 | 8                    | T-Mt.Sali3-<br>2-1:2:1             | 34                                                | 1,02                            |
| EXP-<br>At.GSP571.nno+At.GS               | 10                   | T-Mt.Sali3-<br>2-1:2:1             | 34                                                | 0,95                            |

|               |   |                         |    |      |
|---------------|---|-------------------------|----|------|
| I102.nno:1    |   |                         |    |      |
| EXP-At.GSP571 | 4 | T-<br>Zm.GST7.nno:<br>2 | 44 | 0,46 |

[00196] Как видно из таблицы 13, EXP-EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:8) и EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10) продемонстрировали экспрессию в протопластах листьев хлопчатника. Синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST7.nno:10 (SEQ ID NO:44) функционировала аналогично эндогенной 3'-нетранслируемой области T-Mt.Sali3-2-1:2:1.

[00197] Последовательность EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) клонировали в векторы экспрессии растений, функционально связанные 5' с кодирующей последовательностью GUS (SEQ ID NO:42), функционально связанной 5' с эндогенной 3'-нетранслируемой областью T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO:35). Два вектора экспрессии контрольного растения были сконструированы с использованием EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), о которой известно, что она плохо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника, и последовательности EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), которая хорошо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника. Контрольные последовательности EXP были функционально связаны с одной и той же последовательностью 3'-нетранслируемой области и GUS. Средние значения GUS/FLUC для нескольких трансформаций представлены в таблице 14.

**Таблица 14. Средние значения GUS/FLUC для трансформированных протопластов листьев хлопчатника**

| EXP                          | EXP SEQ ID NO: | 3'-нетранслируемая область | 3'-нетранслируемая область, SEQ ID NO: | Среднее значение GUS/FLUC |
|------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------------------|---------------------------|
| EXP-Gm.Sphas1:1:1            | 52             | T-Mt.Oxr-1:2:1             | 35                                     | 0,01                      |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 | 51             | T-Mt.Oxr-1:2:1             | 35                                     | 2,30                      |

|                                          |    |                    |    |      |
|------------------------------------------|----|--------------------|----|------|
| EXP-<br>At.GSP564.nno+At.<br>GSI17.nno:2 | 16 | T-Mt.Oxr-<br>1:2:1 | 35 | 0,34 |
|------------------------------------------|----|--------------------|----|------|

**[00198]** Как видно из таблицы 14, синтетический EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:16) продемонстрировал экспрессию в протопластах листьев хлопчатника.

**[00199]** Последовательность EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22), клонировали в векторы экспрессии растения, функционально связанные 5' с кодирующей последовательностью GUS (SEQ ID NO:42), функционально связанной 5' с эндогенной 3'-нетранслируемой областью T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO:37). Два вектора экспрессии контрольного растения были сконструированы с использованием EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), о которой известно, что она плохо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника, и последовательности EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), которая хорошо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника. Контрольные последовательности EXP были функционально связаны с одной и той же последовательностью 3'-нетранслируемой области и GUS. Средние значения GUS/FLUC для нескольких трансформаций представлены в таблице 15.

**Таблица 15. Средние значения GUS/FLUC для трансформированных протопластов листьев хлопчатника**

| EXP                               | EXP SEQ ID NO: | 3'-нетранслируемая область | 3'-нетранслируемая область, SEQ ID NO: | Среднее значение GUS/FLUC |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------------------|---------------------------|
| EXP-Gm.Sphas1:1:1                 | 52             | T-Mt.RD22-1:2:1            | 37                                     | 0,01                      |
| EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3      | 51             | T-Mt.RD22-1:2:1            | 37                                     | 2,88                      |
| EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 | 22             | T-Mt.RD22-1:2:1            | 37                                     | 1,19                      |

**[00200]** Как видно из таблицы 15, синтетический EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22), продемонстрировал

экспрессию в протопластах листьев хлопчатника.

На основании иллюстраций и описаний принципов настоящего изобретения специалистам в данной области должно быть очевидно, что изобретение можно модифицировать в отношении деталей и схем, не отступая от таких принципов. Формула изобретения включает в себя все модификации, соответствующие духу и объему формулы изобретения. Все публикации и опубликованные патентные документы, процитированные в данном документе, тем самым включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из:

последовательности, по меньшей мере на 85 процентов идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 2;

последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 2; и

фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 2, причем этот фрагмент обладает генорегуляторной активностью.

2. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.

3. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность ДНК по меньшей мере на 90 процентов последовательности идентична последовательности ДНК любой из SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 2.

4. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность ДНК по меньшей мере на 95 процентов последовательности идентична последовательности ДНК любой из SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 2.

5. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность ДНК обладает генорегуляторной активностью.

6. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 2, отличающаяся тем, что гетерологичная транскрибируемая молекула ДНК содержит ген, представляющий агрономический интерес.

7. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 6, отличающаяся тем, что ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к гербицидам.

8. Молекула рекомбинантной ДНК по п. 6, отличающаяся тем, что ген, представляющий агрономический интерес, придает растениям устойчивость к вредителям.

9. Трансгенная растительная клетка, содержащая молекулу рекомбинантной ДНК по п. 1

10. Трансгенная растительная клетка по п. 9, отличающаяся тем, что последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК.

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

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

13. Трансгенное растение или его часть, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК по п. 1.

14. Растение, являющееся потомком трансгенного растения по п. 13, или его часть, отличающееся тем, что растение-потомок или его часть содержит молекулу рекомбинантной ДНК.

15. Трансгенное семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК по п. 1.

16. Способ получения товарного продукта, включающий получение трансгенного растения или его части по п. 13 и получение из него товарного продукта.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что товарный продукт представляет собой белковый концентрат, изолят белка, зерно, крахмал, семена, крупу, муку, биомассу или масло семян.

18. Способ экспрессии транскрибируемой молекулы ДНК, включающий получение трансгенного растения по п. 13 и культивирование растения, в котором экспрессируется транскрибируемая ДНК.

По доверенности

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

Номер евразийской заявки:

**202193030**

**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 № |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| X<br>Y     | WO 2014/004638 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 03.01.2014,<br>список последовательностей, Sequence 7                   | 1-8<br>9-18          |
| Y          | RU 2012120854 A (ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЭЛЭЛСИ и др.) 27.11.2013,<br>формула, реферат, примеры 1-15, абзацы 2-7           | 9-18                 |
| Y          | WO 2009/095881 A2 (NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCES<br>et al.) 06.08.2009, формула, реферат, примеры 1-28 | 9-18                 |

☐ 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

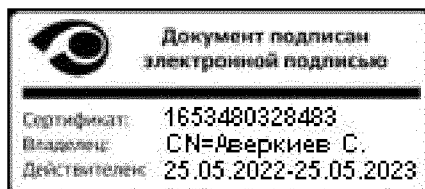
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 04 июля 2022 (04.07.2022)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202193030**

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)