- (43) Дата публикации заявки 2022.07.29
- (22) Дата подачи заявки 2018.01.18

- (51) Int. Cl. C12N 15/113 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
- (54) РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (31) 62/448,019
- (32) 2017.01.19
- (33) US
- (62) 201991714; 2018.01.18
- **(71)** Заявитель:

MOHCAHTO ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС (US)

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

A01H 1/06 (2006.01) **A01H 5/10** (2006.01)

(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.

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 «МОNS436WO-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 генной 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 генной 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: (а) последовательности, меньшей 85 процентов идентичной мере на любой NO:1-29 последовательностей SEO ID 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; идп ЭТОМ последовательность функционально связана С гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. Поп «гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК» подразумевается, что ДНК транскрибируемая молекула 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, 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 меньшей мере на 99 процентов идентична 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 молекула осуществления гетерологичная транскрибируемая ДНК содержит ген, представляющий агрономический интерес, такой как способный обеспечивать устойчивость к гербицидам

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 молекулу трансгенные растительные клетки, содержащие рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности, по меньшей мере 85 приблизительно процентов идентичной любой последовательностей SEO 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 активностью; обладает генорегуляторной фрагмент 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, рекомбинантной содержащее молекулу ДНК, включающую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: а) последовательности, по меньшей мере на 85 процентов идентичной ИЗ последовательностей SEQ ID NO:1-29 и 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 обладает генорегуляторной активностью; NGII MOTE последовательность ДНК функционально связана с гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК В конкретных вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой растениепотомок 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.Cyco:3, содержащей синтетический промотор (P-At.GSP442.nno:2), функционально связанный 5^{\prime} с синтетическим лидером (L-At.GSP442.nno:1), функционально связанным 5^{\prime} с интроном (I-At.Cyco: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. но: 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.Cyco: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.Cyco: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^{\prime} с синтетическим лидером (L-At.GSP571.nno:1), функционально связанным 5^{\prime} 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). но: 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.Cyco: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.Cyco: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. но: 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^{\prime} с синтетическим лидером (L-At.GSP579.nno:1), функционально связанный 5^{\prime} 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.Cyco: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.Cyco-1:1:2), функционально связанным 5′с интроном (I-At.Cyco: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.Cyco: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.Cyco: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.Cyco:2, полученной из гена субъединицы VIa цитохром-соксидавы 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.Cyco:1:1, содержащего промотор (P-At.Cyco-1:1:2), функционально связанный 5 $^{\prime}$ с лидером (L-At.Cyco-1:1:2), функционально связанным 5 $^{\prime}$ с интроном (I-At.Cyco-1:1:1).

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

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

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

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

[0053] SEQ ID NO:43 представляет собой последовательность ДНК EXP, EXP-At.GSP442+LI-At.Cyco, 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.Cyco-1:1:2, функционально связанным 5 с интроном, I-At.Cyco: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.Cyco: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.Cyco: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 $^{\circledR}$ (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.Cyco:2, содержащую промотор и лидер гена бета-глюкуронидазы 21 из Arabidopsis thaliana, функционально связанные 5 с интроном, I- At.Cyco-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 тканях растений и, следовательно, регулировать экспрессию 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 трансгенные растительные клетки, растения, части растений 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 синтетического происхождения, TOесть, K дезоксирибонуклеотидных оснований или молекуле ДНК, считываемой с 5' конца (против хода транскрипции) до 3' конца (по ходу Используемый В данном документе термин ДНК» относится к «последовательность нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Используемая в данном документе номенклатура соответствует номенклатуре раздела 37 Кодекса федеральных правил США, 1.822, и приведена в таблицах 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 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 последовательностей ДНК, существующих в природе, молекулу ДНК, которая содержит синтетическую последовательность молекулу ДНК, которая была включена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генов.

[0072] В контексте данного документа термин «синтетическая 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. 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 примерно 25 нуклеотидов непрерывной последовательности.

[0073] Ссылка в настоящей заявке на «выделенную молекулу или эквивалентный термин или фразу предназначена обозначения того, что молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в комбинации с 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 ДНК 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 частей будет «выделен» рамках элементов ИX В 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 ДНК в фланкируют молекулу ee нативном или естественном Таким образом, молекулы ДНК, конденсированные регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не связаны, например, в результате рекомбинантных технологий, в данном документе считаются выделенными. молекулы считаются выделенными в случае, когда они интегрированы XPOMOCOMY 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 растения бактерии присутствующая клеток ИЛИ или BO внехромосомном векторе, должна рассматриваться как выделенная нуклеотидная последовательность вне зависимости TOPO, 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 пве оптимально выровненные полинуклеотидные последовательности или оптимально выровненные полипептидные последовательности идентичными. Оптимальное являются 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, или брешами нуклеотидов. Используемый документе термин «эталонная последовательность» относится последовательности ДНК, представленной в виде SEQ ID NO:1-32 и SEO 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 совпадений нуклеотидов в оптимальном выравнивании, на общее количество разделенное нуклеотидов в эталонной последовательности, например, общее количество нуклеотидов полной длине всей эталонной последовательности. Таким образом, один вариант осуществления изобретения относится к молекуле ДНК, последовательность, содержащей 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 86 меньшей процентов, идентична мере на 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 91 меньшей мере на процент, идентична последовательности по меньшей мере на 92 процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на 93 процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере на процента, идентична эталонной последовательности по меньшей мере процентов, идентична эталонной последовательности 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 процентов или идентична эталонной последовательности по меньшей 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 COCTOMT И ВN блока TATA или транскрипции эквивалентной последовательности для распознавания и связывания комплекса РНКполимеразы II для инициации транскрипции.

Регуляторные элементы

[0076] Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидеры известные как 5'-нетранслируемые области), интроны и области терминации транскрипции (или 3'-нетранслируемые области), играют неотъемлемую роль в общей экспрессии генов в живых клетках. Используемый В данном документе «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 «ЕХР» 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 5 'с лидерной последовательностью. ЕХР, применимая 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.

Регуляторные элементы могут характеризоваться присущим им паттерном экспрессии генов, например, положительными и/или отрицательными эффектами, такими как конститутивная ИЛИ временная, пространственная, развивающая, 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 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 других белков, таких как транс-действующие факторы транскрипции, для инициации транскрипции. Промотор может быть первоначально выделен из 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) геномной копии Альтернативно, промоторы МОГУТ быть гена. 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 20, 25, 27, 31 и 39 или их фрагментах или 13, 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, TOесть, OHN 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 которой обладает исходная промотора, промотора, из которой он получен, или фрагмент может содержать «минимальный промотор», который обеспечивает основной уровень транскрипции И COCTONT ИЗ ТАТА-бокса ИЛИ эквивалентной последовательности ДНК для распознавания и связывания комплекса РНК-полимеразы II для инициации транскрипции.

[0081] В варианте осуществления представлены ОДНОМ фрагменты последовательности промотора, раскрытой документе. Фрагменты промотора могут содержать активность промотора, как описано выше, и могут быть применимы поотдельности или в комбинации с другими промоторами и фрагментами промотора, например, при конструировании химерных промоторов, или в комбинации с другими элементами экспрессии и фрагментами экспрессии. В конкретных вариантах осуществления элемента 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 документе. В определенных вариантах осуществления изобретение предоставляет фрагменты промотора, представленного в настоящем обладающие активностью последовательности документе, полной Способы получения фрагментов таких 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 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 любы элементов, которые оказывают положительный или отрицательный; тканеспецифический, клеточноспецифический или времяспецифический (например, не ограничиваясь ими, циркадный 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 Лидеры, применимые для реализации на практике . MOGOTOMOGI 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 трансляцию или функционально транскрипцию 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 трансляцию ИЛИ 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, 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 экспрессии функционально для модуляции 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» (ІМЕ) 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-ls1) 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 ВN A . thaliana. Было показано, 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. З'-нетранслируемая область молекулы мРНК тэжом быть создана путем специфического расщепления и полиаденилирования, также известного как полиА-хвост. нетранслируемая область может быть расположена далее по ходу транскрипции относительно транскрибируемой молекулы ДНК 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 субъединиц РуБисКо гороха, область З′ хлопчатника Е6 и нетранслируемая область койсина.

[0089] З'-нетранслируемые области обычно находят полезное применение для рекомбинантной экспрессии специфических молекул Слабая 3'-нетранслируемая область обладает надлежащим ДНК. потенциалом для генерации считывания, что может повлиять на экспрессию молекулы ДНК, расположенной в соседних экспрессии. Соответствующий контроль терминации транскрипции предотвращать считывание последовательностей тэжом 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 PHKполимеразы II ИЗ ДНК) является необходимым условием ДЛЯ повторной инициации транскрипции и, таким образом, напрямую общий уровень транскрипции. После терминации влияет на зрелая мРНК высвобождается из сайта синтеза переносится в цитоплазму. Эукариотические мРНК накапливаются in vivo в виде поли(A)-форм, что затрудняет обнаружение сайтов транскрипции обычными способами. Тем терминации не менее, прогнозирование местонахождения функциональных и эффективных 3'нетранслируемых областей С использованием способов биоинформатики отсутствием затруднено консервативных ДНК, последовательностей которые позволили бы прогнозировать наличие эффективной 3'-нетранслируемой области.

[0090] С практической точки зрения, как правило, выгодно, чтобы З'-нетранслируемая область, используемая в кассете экспрессии, обладала следующими характеристиками. Во-первых, 3'нетранслируемая область должен иметь возможность эффективно и действенно терминировать транскрипцию трансгена и предотвращать считывание транскрипта в любую соседнюю последовательность ДНК, которая может состоять из другой кассеты экспрессии, как кассет экспрессии, находящихся случае множества одной (Т-ДНК), или соседней хромосомной ДНК, транспортной ДНК которую вставлена Т-ДНК Во-вторых, З'-нетранслируемая область не 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 обратно транскрибированной 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 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 ЦИСдействующему регуляторному элементу, так называемому цис-элементу, который аспект общей модели экспрессии, обычно придает НΟ его недостаточно для стимуляции транскрипции функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. В отличие \circ T промоторов, энхансерные элементы обычно не включают сайт начала транскрипции (TSS) или ТАТА-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).

Считается, ЧТО многие промоторные энхансерные элементы связывают ДНК-связывающие белки и/или влияют ДНК, конформации, топологию создавая локальные избирательно разрешают или ограничивают доступ РНК-полимеразы к матрице ДНК или которые способствуют селективному открытию двойной спирали сайте инициации транскрипции. на Элемент энхансера тэжом обеспечивать связывание транскрипционных регулирующих транскрипцию. Некоторые энхансерные факторов, 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, делеционный включая анализ, TOесть, удаление одного или нескольких нуклеотидов с 5'-конца или ВN внутренней части промотора; анализ связывания ДНК с использованием ДНКазы

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 цисэлементов ИЛИ энхансерных элементов В качестве последовательности-мишени или мотива-мишени с помошью традиционных методов сравнения последовательностей ДНК, таких 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 дополнительными фланкирующими нуклеотидами, С которые содержат применимые сайты рестрикционных ферментов для облегчения манипулирования подпоследовательностью. Таким данное изобретение охватывает образом, разработку, конструирование и использование энхансерных элементов 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, 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 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 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 амплификации йомкап химический ИЛИ синтез регуляторного элемента, 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 ДНК, которые последовательностям 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, тэжом 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 сходный функциональность, TOесть, TOT же ИЛИ 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, версия С такую как различными

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 сравнением 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, идентичны последовательности ДНК исходного регуляторного элемента, сохраняя при этом общую функциональность, т. е., тот же паттерн экспрессии, что и у исходного регуляторного элемента, подобный ему. Изготовление таких вариантов изобретения ИЛИ 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 трансгена может быть проверена эмпирически при выполнении анализов стабильной и транзиентной экспрессии у растений, таких как описанные в рабочих примерах, с целью подтверждения результатов, которые могут варьируются 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 кольцеваямолекула 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, функционально связана. Используемый в данном документе термин «вектор» любую конструкцию, которая означает тэжом быть использована C целью трансформации, то есть, введения

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

186001 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 транскрибируемой молекулой ДНК, если промотор модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой молекулы ДНК 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 (Ті), имеют правую граничную (RB или AGRtu.RB) и левую граничную (LB или AGRtu.LB) области плазмиды Ті, 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, 6,603,061). Конструкции патент США 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 селектируемого как Spec/Strp, который маркера, такого кодирует аминогликозидаденилтрансферазу Tn7 (aadA), придающую устойчивость к спектиномицину или стрептомицину, ИЛИ

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 Для практического применения изобретения 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 Ті-плазмиды Agrobacterium tumefaciens и вектора контроля переноса pCaMVCN.

[00101] В конструкцию могут быть включены 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 получения желательных регуляторных признаков. варианте осуществления конструкции в соответствии с изобретением меньшей мере ОДИН регуляторный содержат ПО 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 хлоропласт, лейкопласт или белка, в частности на пластидную органеллу; митохондрию; пероксис; вакуоль; ИЛИ Многие внеклеточное местоположение. локализованные В хлоропластах белки экспрессируются из ядерных генов в качестве предшественников и нацеливаются хлоропласт транзитным на пептидом хлоропласта (CTP). Примеры таких выделенных хлоропластных белков включают, но не ограничиваются ими, белки, (SSU) малой субъединицей рибулозо-1,5 бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксин, оксидоредуктазу ферредоксина, белок I и белок II светособирающего комплекса, F енолпирувилшикиматфосфатсинтазу N Транзитные пептиды хлоропласта описаны, например, в патенте США № 7,193,133. Выло продемонстрировано, что нехлоропластные белки быть нацелены на хлоропласт посредством экспрессии МОГУТ гетерологичной CTP, 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 ограничиваясь ими, молекулы, имеющие последовательности, белок, И молекулы, продуцирующие кодирующие молекулы 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 модифицированную версию трансгена. Типичные образом транскрибируемые молекулы ДНК для включения в конструкции 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 функционально промотор по настоящему изобретению, может быть гетерологичной транскрибируемой молекулой 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 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, TOесть, в естественных условиях транскрибируемая молекула ДНК не является функционально связанной с регуляторным элементом.

[00107] Транскрибируемая молекула ДНК, как правило, может любой молекулой ДНК, для которой желательна экспрессия транскрипта. Такая экспрессия транскрипта может привести К молекулы мРНК и, таким трансляции полученной образом, 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 транскрибируемой ДНК, использования молекулы 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] образом, одним вариантом осуществления Таким изобретения является молекула рекомбинантной ДНК, содержащая регуляторный элемент по изобретению, такой как виде SEQ ID NO:1-32 и SEQ ID NO: 43-45, представленные в 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 трансгенной растительной клетки. В одном варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК содержит кодирующую белок область 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 растении, оказывая влияние на морфологию растения, физиологию, рост, развитие, урожайность, состав зерен, профиль питания, устойчивость К болезням ИЛИ вредителям 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 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 представляющего агрономический интерес тэжом 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, устойчивости к гербицидам (патенты США №№ 6,803,501; 6,448,476; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 6,248,876; 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; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,713,063; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,521,442; 6,501,009; 6,537,756; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,156,573; 6,153,814; 6,177,615; 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 6,228,992), устойчивость к (патент США N_0N_0 бактериальным инфекциям (патент США № 5,516,671), рост и развитие растений (патенты США N_0N_0 6,723,897 и 6,518,488), выработка крахмала (патенты США $N_{\bar{0}}N_{\bar{0}}$ 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 $\mathbb{N}\mathbb{N}$ 6,380,466), созревание фруктов (патент США $\mathbb{N}\mathbb{N}$ 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 США NºNº 6,072,103), (патент фармацевтические пептиды пептиды (патенты США №№ 6,812,379; 6,774,283; секретируемые 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 $N_{\bar{0}}N_{\bar{0}}$ 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 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-, трансдействующей 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) опосредованных косупрессией механизмов. РНК также тэжом 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 любой транскрибируемой молекуле трансген» относится к экспрессия которой в трансгенном растении, ткани или клетке или отсутствие может быть подвергнута скринингу или оценена каким-либо образом. Селектируемые маркерные гены и связанные с отбора и скрининга для применения в практике методы изобретения известны в данной области И включают, ограничиваются ими, транскрибируемые молекулы ДНК, кодирующие ßглюкуронидазу (GUS), зеленый флуоресцентный белок (GFP).), белки, которые придают устойчивость к антибиотикам, 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] «трансформация» относится Термин K введению молекулы ДНК В реципиента-хозяина. Используемый 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 тэжом 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 клетку реципиента таким образом, что введенная молекула ДНК не последующим потомством. Термин наследуется «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 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 продемонстрированных способов. Подходящие способы включают, но ограничиваются ими, бактериальную инфекцию (например, Agrobacterium), бинарные векторы ВАС, прямую доставку PEG-опосредованной (например, посредством трансформации, опосредованному обезвоживанием/ингибированием поглощению ДНК, электропорации, возбуждению волокнами карбида кремния И частиц, покрытых ДНК) и редактирование (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, НΟ не ZFN(нуклеаза цинкового ограничиваются $_{I}$ пальца), мегануклеазы, TALEN (эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции) и CRISPR (кластеризованные регулярно пересекающиеся короткие палиндромные повторы)/Саѕ (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 быть регенерировано из трансгенной растительной клетки в соответствии с изобретением. Из такого трансгенного растения могут быть семена С использованием стандартных способов получены размножения или самоопыления. Такое семя и полученное растениепотомок, выращенное из такого семени, будут содержать молекулу ДНК рекомбинантной 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 рекомбинантной ДНК) ПО молекуле ИЛИ скрещиваться нетрансгенными растениями или различными трансгенными растениями для получения семян в случае гетерозиготных трансгенных растений соответствии с изобретением (гетерозиготные ПО молекуле ДНК). рекомбинантной 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 соответствии с изобретением, ОНЖОМ собирать растения в использовать для выращивания поколений трансгенных растений, 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, 50-98 (1960); Simmonds, Principles Davis, CA, of Inc., NY, 369-399 (1979);Longman, Sneep Hendriksen, Plant breeding Perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Improvement, Production Sovbeans: and Uses, 2nd Edition, Fehr, 16:249 (1987);Principles Monograph, of 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 уровни экспрессии и/или профиль, обеспечиваемый интерес и 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 нозернблоты, подходы на основе ПЦР, биохимические анализы, методы фенотипического скрининга, полевые оценки Экспрессия иммунодиагностические анализы. 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 TagMan®. экспрессии трансгена Кроме того, для оценки МОГУТ быть способы Invader® (Third использованы реагенты и 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

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

[00123] Изобретение также обеспечивает товарный продукт, трансгенного растения или который получают ENсодержащей молекулу рекомбинантной ДНК В соответствии изобретением. Товарные продукты в соответствии с изобретением определяемое количество ДНК, последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID 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 обработанные семена, зерна, части растений и Товарный продукт в соответствии с изобретением будет содержать количество ДНК, соответствующее определимое молекуле рекомбинантной ДНК в соответствии с изобретением. Обнаружение нескольких из йоте ДНК в образце может использовано для определения содержания или источника товарного продукта. Может быть использован любой стандартный обнаружения молекул ДНК, включая способы обнаружения, раскрытые в данном документе.

[00124] Изобретение тэжом быть более легко посредством ссылок на последующие примеры, которые представлены 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, 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 (ЕХР). 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 различные паттерны экспрессии, применимые обеспечивают СТИМУЛЯЦИИ экспрессии ХИПОНМ различных кодирующих последовательностей И интерферирующих PHK, представляющих агрономический интерес.

[00126] Разработанные с использованием соответствующих компьютерных программ синтетические регуляторные элементы не имеют расширенной ГОМОЛОГИИ ИН С какими известными последовательностями нуклеиновых кислот, которые существуют в природе. Синтетические ЕХР и соответствующие промоторы, лидеры, интроны и 3'-нетранслируемые области представлены в таблице 1. Синтетические ЕХР были клонированы с использованием способом, данной области известных В техники, В бинарные трансформации растений, функционально связанные с кодирующей последовательностью для β -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 ЭКЗОНОМ может быть выполнен с использованием трансформированной растительной ткани. Вкратце, растения трансформируют растительными векторами экспрессии, содержащими фрагменты ДНК, функционально клонированные связанные гетерологичной транскрибируемой молекулой ДНК. использовали систему 5' RACE для быстрой амплификации концов кДНК, версия 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) для подтверждения TSS синтетического регуляторного элемента 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 ЕХР, связанные в направлении 5 '→ 3' (SEQ ID NO):
EXP- At.GSP442.nno+At. 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: P-At.GSP571.nno:5
EXP-			(SEQ ID NO:5), L-
At.GSP571.nno+At.	7	855	At.GSP571.nno:1 (SEQ ID
Cyco:2			NO:6), I-At.Cyco:2 (SEQ ID
			NO:33)
			EXP: P-At.GSP571.nno:5
EXP-			(SEQ ID NO:5), L-
At.GSP571.nno+At.	8	816	At.GSP571.nno:1 (SEQ ID
GSI21.nno:10			NO:6), I-At.GSI21.nno:2
			(SEQ ID NO:9)
I-At.GSI21.nno:2	9	309	Интрон
			EXP: P-At.GSP571.nno:5
EXP-			(SEQ ID NO:5), L-
At.GSP571.nno+At.	10	810	At.GSP571.nno:1 (SEQ ID
GSI102.nno:1			NO:6), I-At.GSI102.nno:1
			(SEQ ID NO:11)
I-At.GSI102.nno:1	11	310	Интрон
			EXP: P-At.GSP564.nno:3
EXP-At.GSP564	12	500	(SEQ ID NO:13), L-
LMI MC.OSI 304	12		At.GSP564.nno:1 (SEQ ID
			NO:14)
P-At.GSP564.nno:3	13	461	Промотор
L-At.GSP564.nno:1	14	39	Лидер
			EXP: P-At.GSP564.nno:3
EXP-			(SEQ ID NO:13), L-
At.GSP564.nno+At.	15	855	At.GSP564.nno:1 (SEQ ID
Cyco:2			NO:14), I-At.Cyco:2 (SEQ
			ID NO:33)
			EXP: P-At.GSP564.nno:3
EXP-			(SEQ ID NO:13), L-
At.GSP564.nno+At.	16	807	At.GSP564.nno:1 (SEQ ID
GSI17.nno:2			NO:14), I-At.GSI17.nno:1
			(SEQ ID NO:17)
I-At.GSI17.nno:1	17	300	Интрон

			EXP: P-At.GSP564.nno:3
EXP-			(SEQ ID NO:13), L-
At.GSP564.nno+At.	18	810	At.GSP564.nno:1 (SEQ ID
GSI102.nno:1			NO:14), I-At.GSI102.nno:1
			(SEQ ID NO:11)
			EXP: P-At.GSP579.nno:2
			(SEQ ID NO:20), L-
EXP-At.GSP579	19	500	At.GSP579.nno:1 (SEQ ID
			NO:21)
P-At.GSP579.nno:2	20	449	Промотор
L-At.GSP579.nno:1	21	51	Лидер
			EXP: P-At.GSP579.nno:2
EXP-			(SEQ ID NO:20), L-
At.GSP579.nno+At.	22	810	At.GSP579.nno:1 (SEQ ID
GSI102.nno:3	22	010	NO:21), I-At.GSI102.nno:1
001102.11110.0			(SEQ ID NO:11)
			EXP: E-At.GSP571.nno:1
			(SEQ ID NO:24), P-
EXP-			At.GSP442.nno:2 (SEQ ID
At.GSP571.nno+At.	23	1350	NO:2), L-At.GSP442.nno:1
GSP442.nno+At.Cyc	20	1300	(SEQ ID NO:3), L-At.Cyco-
0:1			1:1:2 (SEQ ID NO:40), I-
			At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
E-At.GSP571.nno:1	24	422	Энхансер
110.001371.11110.1		122	Химерный промотор Е-
			At.GSP571.nno:1 (SEQ ID
P-At.GSP571/442	25	902	NO:24), P-At.GSP442.nno:2
			(SEQ ID NO:2)
			EXP: P-At.GSP576.nno:4
EXP-			(SEQ ID NO:27), L-
At.GSP576.nno+At.	26	800	At.GSP576.nno:2 (SEQ ID
GSI17.nno:3	۷ ۷		NO:28), I-At.GSI17.nno:1
GOII/ · IIIIO ; O			(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- At.GSP221+At.Cyco :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-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- At.GSP576.nno+At. 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.

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

[00130] Регуляторные элементы были клонированы в базовые экспрессии растений с использованием стандартных векторы 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 ЕХР, функционально связанную 5′ с кодирующей последовательностью для β -глюкуронидазы (GUS, GOI-ID NO:42) содержащей модифицируемый Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ полученный из светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально 5′ с 3'-нетранслируемой областью гена Gossypium barbadense FbLate-2 (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36) И 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-b-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 флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронидом общем реакционном объеме 50 микролитров. 4-метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцентен высоком рH, где гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно И регулирует рН для количественного останавливает анализ 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_0 : корень стадии V5, лист (накопительная ткань) и лист (источник); корень стадии R_1 , лист (черешок), лист (источник) и цветки; семена стадии R_3 (незрелые семена и стручок), семена стадии R_5 (семядоли) и семена стадии R_8 (зародыш и семядоли). В таблице 2 показана средняя количественная экспресия GUS для каждой из отобранных тканей, стимулированных тестируемыми группами регуляторных элементов EXP, где $ext{M}/0$ 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.

		EXP-	EXP-	EXP-	
Стадия	On Tali	At.Cyco:1:	At.GSP442.nno	At.GSP221+At.	
развития	Орган	1 (SEQ ID	+At.Cyco:3	Cyco:3 (SEQ	
		NO:38)	(SEQ ID NO:1)	ID NO:30)	
	Корень	151	399	928	
	Лист				
V5	(накопитель	39	65	59	
٧٥	ная ткань)				
	Лист	52	109	100	
	(источник)		103	100	
	Корень	H/O	616	1893	
	Лист	97	470	136	
R1	(черешок)				
	Лист	46	177	240	
	(источник)		± ' '		
	Цветы	71	277	140	
	Незрелые	64	477	Н/О	
R3	семена		1,,	117 0	
	Стручок	84	575	702	
R5	Семя	91	564	58	
110	(семядоля)				
	Семя	57	149	301	
R8	(шидочве)	,	110		
	Семя	100	1118	414	
	(семядоля)	100	1110		
[0013	351 Kar but		Эпини 2 мами	TAG WE TRUTT	

[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 (SEO ID NO:31), и лидер, L-At.GSP221:1 (SEQ ID NO:32), EXP-At.GSP221+At.Cyco: 3 (SEQ NO:30), также обеспечивают более высокие уровни конститутивной экспрессии в большинстве анализируемых органов по эндогенной EXP-At.Cyco:1:1 и сравнению демонстрируют согласованную TSS. Однако TSS EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 не был расположен в предполагаемом месте - присутствовало несколько потенциальных элементов ТАТА. Это создает потенциальные проблемы для множества транскриптов, которые могут привести к множеству последовательностей. Таким образом, кодирующих 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 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 cuntetuveckux 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 β -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения

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

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 EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 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.

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

	Корень	40	57	165	579
V5	Лист (накопительн ая ткань)	650	612	792	1683
	Лист (источник)	1379	1090	1475	2128
	Корень	110	H/O	457	645
R1	Лист (черешок)	951	1091	1267	1167
IVI	Лист (источник)	1995	3538	2094	2129
	Цветы	703	830	1408	350
R3	Незрелые семена	75	609	495	232
	Стручок	852	2228	4014	1535
R5	Семя (семядоля)	650	474	540	1433
R8	Семя (зародьш)	1153	1004	603	1122
	Семя (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 изменяло экспрессию во многих органах, обеспечивая средства для «точной настройки» конститутивной экспрессии. экспрессии наблюдали при функциональном связывании синтетических интронов I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) и I-At.GSI102.nno:1 (SEQ NO:11). Синтетические интроны усиливали экспрессию ID 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-

Аt.GSI102.nno:1 и эндогенного интрона I-At.Cyco: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.Cyco:2 усиливали экспрессию, при этом I-At.GSI21.nno:2 обеспечивал высокий уровень усиления экспрессии, а I-At.Cyco: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 NO:5) и лидер L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6), содержащийся в EXP-At.GSP571 ID NO:4), обеспечивают конститутивную (SEQ функционально связанного экспрессию трансгена в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетическая EXP, At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7), которая включает в себя интрон Arabidopsis I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) EXP-At. И GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEO 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) Ι-NO:11) соответственно, обеспечивают At.GSI102.nno:1 (SEQ ID уникальные паттерны конститутивной экспрессии стабильно трансформированных растениях сои. Синтетические интроны, 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 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

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

СОИ трансформировали Растения 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 EXP содержал синтетический дотомодп синтетических NO:13) и синтетический At.GSP564.nno:3 (SEO ID NO:14). EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 At.GSP564.nno.1 (SEO ID 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 примере 2, за исключением того, что каждый из векторов ЕХР At.GSP564 содержал 3'-нетранслируемую область T-Mt.Oxr-1:2:1 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.

Стотия		EXP-	EXP-	EXP-	EXP-
Стадия	0	At.GSP564	At.GSP564	At.GSP56	At.GSP564
развит	Орган	(SEQ ID	.nno+At.C	4.nno+At	.nno+At.G
ЯИ		NO:12)	yco:2	.GSI17.n	SI102.nno

			(SEQ ID	no:2	:1
			NO:15)	(SEQ ID	(SEQ ID
				NO:16)	NO:18)
	Корень	61	108	54	145
	Лист				
V5	(накопительн	38	220	89	259
V 3	ая ткань)				
	Лист	74	421	200	1220
	(источник)	/ 4	421	209	1229
	Корень	118	165	2348	627
	Лист	0.0	235	273	148
R1	(черешок)	90	233	275	140
KI	Лист	140	205	436	917
	(источник)	140	203	430	917
	Цветы	66	91	H/O	305
	Незрелые	26	H/O	101	Н/О
R3	семена	20	п/О	101	п/О
	Стручок	40	H/O	749	H/O
R5	Семя	25	88	78	61
KJ	(семядоля)	2.5	00	/ 0	0.1
	Семя	38	97	127	70
R8	(зародыш))	<i>Э I</i>	137	, , ,
KÖ	Семя	79	200	655	570
	(семядоля)	/9	288	655	572
		L из табли	I пы 4. синт	L 'етический	————————И М. СОТОМОСТ

[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 каждого органа. Например, усиление уровню усиления для синтетического интрона I-At.GSI102.nno:1 использованием источнике (лист) V5 было выше, чем усиление, наблюдаемое использованием синтетического интрона I-At.GSI17.nno:1. В корне R1 усиление использованием синтетического 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 лидер, L-At.GSP564.nno:1 (SEQ NO:13) и содержащий EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12), обеспечивает конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетическая ЕХР, 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) EXP-И 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 (SEO ID NO:11) соответственно, обеспечивают уникальные паттерны конститутивной экспрессии в стабильно трансформированных растениях сои. Синтетические интроны 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 β -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- At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22)		
	Корень	187		
V5	Лист (накопительная ткань)	311		
	Лист (источник)	458		
	Корень	148		
R1	Лист (черешок)	118		
KI	Лист (источник)	425		
	Цветы	130		
R3	Незрелые семена	H/O		
1(3	Стручок	H/O		
R5	Семя (семядоля)	H/O		
R8	Семя (зародыш)	127		
100	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 основании предыдущих примеров, вывести которых на В синтетический интрон I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11) функционально связан с другими конститутивными синтетическими I-At.GSI102.nno:1 промоторами; 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.Cyco: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 β -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

вектор, содержащий [00154] Растительный бинарный 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 β -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEO ID NO:42), содержащей перерабатываемый интрон, полученный из светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: Х04753), функционально связанный 5′ с 3'-нетранслируемой областью из гена FbLate-2 Gossypium barbadense (T-Gb.FbL2:1, SEQ 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
	лист, черешок	223,68
8 узел -	Лист, накопительная ткань	612,14
	Лист, источник	618,9
До оплодотворения -	квадратные прицветники	381 , 69
	квадратные бутоны	347,22
Цветение,	пыльник	64,66
45010m201	Цветение, завязь	210,92
8DAP	Стенка семенной коробочки	835 , 94

[00156] Как видно из таблицы 6, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 экспрессируется во всех отобранных тканях. Наивысшая экспрессия наблюдалась в листе 4 узла, наинизшая - в пыльнике во время цветения. Экспрессия в источнике 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.Cyco:2 EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) в усиливает P-At.GSP571.nno:5 экспрессию промотора 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 β -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.Cyco:1 (SEQ ID NO:23), которая состоит из синтетического химерного промотора P -At.GSP571/442 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.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Cyco: 2 (SEQ ID NO:33). Трансгенная кассета GUS содержала EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1, функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для β -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEO ID NO:42), содержащей перерабатываемый интрон, полученный 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.Cyco (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.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5 с интроном, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). Винарные 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-

		EXP-At.GSP442+L- I-At.Cyco (SEQ ID NO:43)	At.GSP571.nno+At.GSP4 42.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23)
Стадия	Орган	Среднее значение	Среднее значение
V5	Лист, накопительная ткань	69,61	72,12
V 5	Лист, источник	88,22	96,06
	Корень	74,67	102,9
	Цветы	79,16	62,01
	лист, черешок	77,07	87
R1	Лист, источник	66,59	114,33
	Корень	76 , 88	123,12
	Стручок	93,19	102,54
R3	Семя, незрелое	71,15	61,62
R5	Семя, семядоля	78 , 72	92,83

	R8	Семя, 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 отобранных Oбe EXP обеспечивали конститутивную тканях. В стабильно трансформированных растениях экспрессию Синтетическая 3'-нетранслируемая область T-Zm.GST59.nno:1 3'-нетранслируемой функционировала аналогично естественной 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 β -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.Cyco:1 (SEQ ID NO:23), которая состоит из синтетического химерного промотора P -At.GSP571/442 NO:25), содержащего синтетический энхансер 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, At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), функционально связанным 5′ с лидером, L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), который функционально связан 5' с интроном, I-At.Cyco: 2 (SEQ ID NO:33). Трансгенная кассета GUS содержала EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1,

функционально связанную 5' с кодирующей последовательностью для β -глюкуронидазы (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42), полученный перерабатываемый HOGTHN, светочувствительного тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: X04753), функционально связанный 5′ с синтетической 3'-нетранслируемой областью T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ NO:29). ID 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	
	лист, черешок	нпо	
8 узел -	Лист, накопительная ткань	108,39	
	Лист, источник	294 , 99	
До оплодотворения -	квадратные прицветники	78 , 84	
	квадратные бутоны	118,21	
II DO TO SANCO	ПЫЛЬНИК	69,19	
Цветение,	Цветение, завязь	69 , 78	
8DAP	Стенка семенной	159 , 58	

коробочки

EXP-[00165] Как таблицы 8, видно ИЗ At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 (SEO ID NO:23) была способна стимулировать конститутивную экспрессию GUS отобранных тканях. Экспрессия в черешке была определена ниже предела обнаружения. Наивысшая экспрессия проявлялась в листе (источник) узла. Экспрессия была относительно равной 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.

Пример 9.

Анализ синтетической EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1, стимулирующей экспрессию GUS в стабильно трансформированных растениях сои

[00166] Растения СОИ трансформировали вектором, В вектором экспрессии растений, содержащим синтетических регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию β -глюкуронидазы (GUS). Полученные трансгена растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

[00167] Растения сои трансформировали растительным бинарным EXP, содержащим синтетическую EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:45). Трансгенная кассета GUS также содержала 3'-нетранслируемую область гена Gossypium barbadense (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.Cyco:1, представлена в таблице 9.

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

Стадия развития	Орган	Среднее значение
	Корень	60 , 95
V5	Лист (накопительная ткань)	97,43
	Лист (источник)	181,64
	Корень	82,4
R1	Лист (черешок)	208,28
KI	Лист (источник)	214
	Цветы	123,37
R3	Незрелые семена	95,29
CA	Стручок	158,24
R5	Семя (семядоля)	85 , 97
R8	Семя (зародыш)	67,4
NO NO	Семя (семядоля)	52,92
	7.0	

[00168] Как видно из таблицы 9, ЕХР-At.GSP576.nno+At.Cyco:1 NO:45) обеспечивает (SEQ ID 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.Cyco:2 (SEQ ID NO:33), был функционально связан с другими конститутивными синтетическими промоторами, І-At. Cyco: 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 β -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.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38). Tpancrenhue кассеты GUS также содержат 3'-нетранслируемую область гена FbLate-2 barbadense (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36), функционально связанную 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 EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, стимулированная сои, сравнивается с экспрессией, стимулированной EXP-At.Cyco: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 P-At.GSP576.nno:4 (SEO NO:27) IDлидер At.GSP576.nno:2 (SEO ID NO:28) стимулируют конститутивную экспрессию функционально связанного трансгена. Как было показано в примере 4, синтетический интрон I-At.GSI17.nno:1 (SEQ NO:17) усиливал или модулировал экспрессию трансгена во многих органах растения, когда он был функционально связан с ЕХР-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Аналогичным образом можно разумно экспрессия синтетического Pожидать, ЧТО промотора 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 трансгена β -глюкуронидазы (GUS). Полученные растения анализировали на экспрессию белка GUS для оценки влияния выбранной группы синтетических регуляторных элементов на экспрессию.

Растения хлопчатника трансформировали бинарным содержащим синтетическую EXP, EXPвектором, At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO:26), как описано ранее в Примере 10. Трансгенные кассеты GUS также содержали нетранслируемую область гена FbLate-2 Gossypium barbadense (T-NO:36), функционально Gb.FbL2:1, SEQ ID связанную 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 дней после опыления (DAP) для через качественной 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
	лист, черешок	301,57
узел -	Лист, накопительная ткань	159,4
	Лист, источник	577,11
До оплодотворения -	квадратные прицветники	262,66
	квадратные бутоны	223,59
Цветение,	пыльник	171,2
de l'envie,	Цветение, завязь	109
8DAP	Стенка семенной коробочки	433,64
[00175] Van	винио ио поблиц	10 EVD_

[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 8 DAP. Синтетический семенной коробочки на промотор 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 стабильно В 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 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 цисрегуляторных 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, позволяет инициировать транскрипцию с промоторов, представленных в виде SEQ ID NO: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 и 39 фрагментов. Например, синтетический энхансер At.GSP571.nno:1 (SEO ID NO:24) был получен из синтетического промотора P-At.GSP571.nno:5 (SEO ID NO:5) и COCTONT ИЗ С 1 ПО 422 из P-At.GSP571.nno:5, исключая нуклеотидов 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 энхансера относительно других элемента элементов химерных регуляторных элементов также определяется эмпирически, порядок каждого элемента В группе регуляторных элементов может оказывать различное влияние относительных положений зависимости \circ T каждого элемента. Некоторые промоторные элементы будут иметь несколько элементов TATA-бакс или элементов, подобных элементам TATA-forc потенциально несколько начальных сайтов транскрипции. При таких обстоятельствах тэжом 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, данной области техники, для функционального связывания 5' или 3' с элементом промотора или функционального связывания 5' или 3' с дополнительными энхансерными элементами, функционально связанными 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 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 энхансерными дополнительными элементами, полученными ИЗ организмов другого рода, которые функционально промотором, полученным из организма того же или другого рода, приводит к созданию химерного регуляторного элемента.. Вектор трансформации растения для экспрессии GUS может быть сконструирован с использованием способов, известных конструкциям, области, аналогично описанным в примере 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 VСТОЙЧИВОСТЬ K антибиотику спектиномицину; вторую кассету трансгена для тестирования энхансерного элемента, состоящего из энхансерного элемента, функционально связанного 5´ или элементом промотора или функционально связанного 5' или 3' дополнительными энхансерными элементами, которые, СВОЮ очередь, функционально связаны с промотором, который

функционально связан 5' с лидерным элементом, функционально связанным с кодирующей последовательностью для β -глюкуронидазы GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEO ID NO:42), обрабатываемый интрон, полученный из светоиндуцируемого тканеспецифичного гена ST-LS1 картофеля (Genbank Accession: Х04753), 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 других родов, трансформируют с использованием способов, известных в данной области, для проведения анализов транзиентной экспрессии.

[00179] Экспрессия GUS, стимулированная регуляторным элементом, содержащим один или несколько энхансеров, оценивается выполнением анализов стабильной или транзиентной экспрессии у растений, чтобы определить влияние энхансерного элемента 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 результате регуляторных или химерных регуляторных может влиять на транскрипционную активность или специфичность регуляторного ИЛИ химерного регуляторного элемента 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.nno:2, в стабильно трансформированных растениях сои

[00180] Растения сои трансформировали вектором, в

частности, растительными векторами экспрессии, содержащими группы регуляторных элементов, стимулирующих экспрессию трансгена β -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)
	Корень	40	нпо	
V5	Лист (накопительная ткань)	650	88	7,4
	Лист (источник)	1379	278	5 , 0
	Корень	110	72	1,5
R1	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	H/O	
1(0	Семя (семядоля)	2449	H/O	

[00182] 3 **'** -Как видно из Таблицы 11, синтетическая 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 V5. Использование 3'-нетранслируемой области (источник) ослабления экспрессии в стабильно трансформированных растениях имеет широкое применение. Например, 3'-нетранслируемая область тэжом использоваться В сочетании С другими регуляторными элементами, такими как промоторы, лидеры и интроны, для точной настройки экспрессии трансгена, особенно В случаях, высокая экспрессия может привести к не фенотипическим эффектам, которые вредны для трансформированного растения. Анализ полученного транскрипта GUS подтвердил надлежащую терминацию обусловленную синтетической 3'-нетранслируемой транскрипта, областью T-Zm.GST7.nno:2. Синтетическая 3'-нетранслируемая T-Zm.GST7.nno:2 способна модулировать область экспрессию обеспечивать надлежащую терминацию транскрипции в стабильно трансформированных растениях сои.

Пример 14.

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

[00183] Протопласты листьев трансформировали кукурузы векторами, в частности, векторами экспрессии, содержащими тестируемые регуляторные элементы, стимулирующие экспрессию β-глюкуронидазы (GUS). Полученные трансгена 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 для оценки активности синтетических 3 **'** сконструированы нетранслируемых областей: T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) и Т-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29). Также были сконструированы два сконструированных вектора экспрессии. Каждая ИЗ содержала трансгенную конструкций кассету, содержащую ID NO:46), конститутивный промотор и лидер EXP-CaMV.35S (SEQ функционально связанный 5′ с интроном I-Zm.DnaK: 1 (SEQ ID 5′ функционально связанным 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-3′ Zm.GST59.nno:1, функционально связанный с кодирующей последовательностью GUS. Один контрольный вектор содержал 3'нетранслируемую область T-Os.LTP: 1 (SEQ ID 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 использованием способов, известных в данной содержала трансгенную кассету, состоящую из EXP-CaMV.35S (SEQ ID 5′ NO:46), функционально связанной С кодирующей последовательностью, кодирующей флуоресцентный белок люциферазы NanoLuc ® (Promega, Madison, WI 53711), Nluc (SEQ ID NO:49), функционально связан 5′ с 3'-нетранслируемой который был 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 девяносто шести лунок. Двенадцать

микрограммов ДНК тестируемого вектора или ДНК контрольного вектора и шесть микрограммов ДНК вектора NanoLuc [®] использовали трансформации $3,2 \times 10^5$ протопластов на лунку. После трансформации протопласты инкубировали при 25°C в темноте 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 центрифугированием, промывали, ресуспендировали меньшем объеме и переносили в специализированные пробирки в Пробирки снова центрифугировали супернатант N аспирировали, оставляя осадок протопластных клеток. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере QB (100 мМ КРО4, рН 7,8; 1 мМ 1% Triton X-100; 10% глицерин; 1 ЭДТА; MMDTT). 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® (Promega, Madison, WI 53711) в буфере QB. Вкратце, небольшой объем лизата, буфера QB и раствора субстрата для анализа люциферазы Nano-Glo ® в QB смешивали вместе в белых планшетах на девяносто шесть лунок. Флуоресценцию затем измеряли с использованием считывателя для планшетов PHERAstar® (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, 4метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцентен при высоком рН, где гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует рН для количественного определения флуоресцентного Аликвоту лизата смешивали С аликвотой растворенной в буфере QB, и инкубировали при 37 °C. Небольшую аликвоту реакционной смеси лизат/MUG удаляли и добавляли в стопбуфер в три разных момента времени: (1) сразу после смешивания реакционной смеси лизат/МИG (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 «гидролизованный MUG, нМ» брали на основании стандартной кривой для планшета. Также брали аликвоту каждой трансформации для считывания с помощью $NanoLuc^{\otimes}$ ($NanoLuc^{\otimes}$ RLU). Среднее значение гидролизованного MUG (нМ)/NanoLuc® RLU для каждого вектора экспрессии нормировали к вектору экспрессии ЕХР-1/T-Os.LTP:1, установленное CaMV.35S/I-Zm.DnaK: значение которого составляло 100%. В таблице 12 показано усредненное значение средних значений для всех используемых 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 (нM)/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'-

нетранслируемыми 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 β -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 (SEO EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEO ID NO:8), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 ID NO:10), (SEO EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEO ID NO:16) EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22). Элементы экспрессии были клонированы в векторы экспрессии и функционально связаны кодирующей последовательностью GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1 (SEO 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 стимулирована конститутивной люциферазы, которая была последовательностью EXP. Растительный вектор pFLUC содержал трансгенную кассету с конститутивным промотором, функционально связанным 5' с интроном, (EXP-CaMV.35S-Enhm+Zm.DnaK: 1:1, SEQ ID NO: 53), функционально связанным 5' с последовательностью, люциферазу светлячка (*Photinus* pyralis) кодирующей (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, SEO ID NO: 55).

[00194] Протопласты листьев хлопчатника трансформировали с использованием метода трансформации на основе П $\Im\Gamma$, известного в данной области. Протопласты трансформировали плазмидами, pFLUC и pRLUC и эквимолярным количеством экспрессирующих EXP векторов. Измерения GUS и люциферазы проводили путем помещения аликвот лизированного препарата клеток, трансформированных соответствии с описанием выше, в два разных планшета неглубокими лунками. Один планшет использовали для измерений GUS, а второй - для проведения анализа Dual-Luciferase 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 контрольным векторам ЕХР.

[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 ЕХР, EXP-At.Bglu21+At.Cyco: 2 (SEQ ID NO: 50), о которой известно, она плохо экспрессируется в протопластах что листьев хлопчатника, и последовательности EXP, EXP-CaMV.35Senh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), которая хорошо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника. Контрольные последовательности функционально были связаны с одной последовательностью 3'-нетранслируемой области и GUS. Кроме того, растительный экспрессионный вектор, содержащий трансгенную кассету GUS, содержащую EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ функционально связанную с GUS, содержит синтетическую нетранслируемую область, T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) оценки активности синтетической 3'-нетранслируемой значения GUS/FLUC для нескольких трансформаций представлены в таблице 13.

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

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

I102.nno:1				
EXP-At.GSP571	4	T- Zm.GST7.nno:	44	0,46
		2		·

[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 (SEO NO:16) клонировали ID векторы экспрессии растений, функционально связанные кодирующей последовательностью GUS (SEQ ID NO:42), функционально связанной5´ с эндогенной 3'-нетранслируемой областью T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO:35). Два вектора экспрессии контрольного растения были сконструированы с использованием ЕХР, Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), о которой известно, что она плохо экспрессируется В протопластах листьев хлопчатника, последовательности EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 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'- нетранслируе мая область	3'- нетранслируем ая 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- At.GSP564.nno+At.	16	T-Mt.Oxr- 1:2:1	35	0,34
GSI17.nno:2				

[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 векторы экспрессии растения, функционально связанные 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 ЕХР, Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), о которой известно, что она плохо экспрессируется в протопластах листьев хлопчатника, 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	3'- нетранслируе мая область	3'- нетранслируем ая область, SEQ ID NO:	Среднее вначение 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: 44 или 29;

последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 44 или 29; и

фрагмента любой из последовательностей SEQ ID NO: 44 или 29, 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: 44 или 29.
- 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: 44 или 29.
- 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. Транстенное 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 растения, культивирование 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:

202193032

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК) C12N 15/13, 15/113, 15/29, 15/82, 5/04, A01H 5/10

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

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2014/159434 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 02.10.2014, формула, примеры	1-18
A	US 9447423 B2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 20.09.2016, формула	1-18
A	WO 2013/158442 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 24.10.2013, формула	1-18
A	EP 2169058 A2 (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 31.03.2010, примеры, формула	1-18
A	TANGPHATSORNRUANG Sithichoke et al. The effect of different 3' untranslated regions on the accumulation and stability of transcripts of a gfp transgene in chloroplasts of transplastomic tobacco. Plant Mol Biol, 2011, vol.76, pp.385–396	1-18
A	LI Wen Jing et al. Evaluation of seed storage protein gene 3'-untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed. Transgenic Res, 2012, vol.21, pp.545-553	1-18

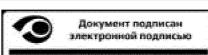
□ последующие документы указаны в продолжении

- * Особые категории ссылочных документов:
- «А» документ, определяющий общий уровень техники
- «D» документ, приведенный в евразийской заявке
- «E» 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
- «Y» 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: 20 июня 2022 (20.06.2022)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Сертификат: 1653480328483 Владелец СN=Аверкиев С. Действителек 25.05.2022-25.05.2023 С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202193032

ЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)