

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290313 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.11

(22) Дата подачи заявки
2020.07.06

(51) Int. Cl. *C12N 15/87* (2006.01)
A01H 9/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ОБЛАСТИ МЕЖГЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/875,752

(32) 2019.07.18

(33) US

(86) PCT/US2020/040883

(87) WO 2021/011216 2021.01.21

(88) 2021.02.18

(71) Заявитель:

МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК
(US)

(72) Изобретатель:

Дэвис Айан У. (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам рекомбинантной ДНК, содержащим новые синтезированные области межгенной последовательности, для применения в растениях для снижения взаимодействия первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой при вставке между первой трансгенной кассетой и второй трансгенной кассетой. Изобретение также относится к трансгенным растениям, клеткам растений, частям растений и семенам, содержащим новые синтезированные области межгенных последовательностей. Изобретение также относится к способам уменьшения взаимодействия между трансгенными кассетами экспрессии с использованием новых синтезированных областей межгенной последовательности.

A1

202290313

202290313

A1

НОВЫЕ ОБЛАСТИ МЕЖГЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5 ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[01] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/875752, поданной 18 июля 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

10 ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[02] Файл с названием «MONS472WO_ST25.txt», содержащий машиночитаемую форму перечня последовательностей, был создан 9 июня 2020 г. Этот файл имеет размер 38698 байт (измерено в MS-Windows®) и одновременно подан посредством электронной подачи (с использованием файловой системы EFS-Web Патентного
15 ведомства США) и полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[03] Изобретение относится к области молекулярной биологии растений и генной инженерии растений. Более конкретно, изобретение относится к молекулам ДНК,
20 используемым для уменьшения влияния одной трансгенной кассеты на экспрессию другой трансгенной кассеты в растениях.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Области межгенных последовательностей («ISR»; англ. Intergenic Sequence Regions) представляют собой последовательности ДНК, которые при размещении между двумя или более трансгенными кассетами уменьшают взаимодействие одной трансгенной кассеты с другой трансгенной кассетой, предотвращая изменение характера экспрессии трансгенных кассет из-за взаимодействия элемента экспрессии
30 между кассетами.

[05] Элементы экспрессии в кассете экспрессии, такие как промоторы, интроны и 3'-нетранслируемые области (3' UTR), содержат действующие в цис-положении элементы, которые могут влиять на экспрессию смежной или соседней кассеты экспрессии. Например, промотор вируса растений, такой как промотор 35S вируса

мозаики цветной капусты (CaMV 35S), состоит из энхансерных доменов, которые могут влиять на транскрипцию близлежащих генов, активируя гены размером до 4,3 Кб выше или ниже места вставки (*Gudynaite-Savitch et al. (2009) Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. Plant Biotechnology Journal, 7: 472-485; Benfey et al. (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. The EMBO Journal, 9:1677-1684*). Например, в одном случае трансгенная кассета, субклонированная в вектор трансформации растений, содержащий кассету отбора с использованием промотора 35S CaMV для управления кодирующей последовательностью селектируемого маркера, подвергалась воздействию промотора 35S CaMV, который изменял тканеспецифичную экспрессию трансгенной кассеты до более конститутивной модели (*Yoo et al. (2005) The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. Planta, 221: 523-530*).

[06] Все чаще в области биотехнологии растений векторы, содержащие несколько трансгенных кассет, используются для трансформации растений с целью введения нескольких агрономически важных характеристик в едином пакетном векторе. Преимущество этого процесса состоит в том, что несколько агрономических признаков могут содержаться в одном генетическом локусе, что обеспечивает более эффективный и менее затратный процесс селекции при скрещивании растения с пакетным вектором с другим трансгенным растением, имеющим дополнительные агрономические характеристики. Однако по мере того, как в вектор клонируется больше кассет экспрессии, существует возможность для элементов экспрессии из одной кассеты экспрессии изменять или влиять на профиль экспрессии другой кассеты экспрессии в пакетном векторе. Кассета экспрессии, разработанная для обеспечения определенного профиля тканевой экспрессии, такого как экспрессия в семенах, может изменять экспрессию в результате взаимодействия между элементами экспрессии соседней кассеты экспрессии в пакетном векторе, изменяя специфичный для семян профиль экспрессии, на более близкий к соседней кассете экспрессии. Это может отрицательно повлиять на предполагаемый фенотип специфичной для семян кассеты экспрессии.

[07] Следовательно, в биотехнологии растений существует потребность в последовательностях ДНК, которые могут уменьшать или предотвращать взаимодействие смежных и соседних кассет экспрессии в пакетном векторе.

[07] Таким образом, изобретатель раскрывает в данном документе новые синтетические ISR, которые минимизируют взаимодействие кассет экспрессии в

пакетном векторе в трансгенных растениях. Эти ISR могут быть размещены между соседними кассетами экспрессии в одном пакетном векторе для предотвращения взаимодействия между элементами экспрессии отдельных кассет, таким образом поддерживая предполагаемый профиль экспрессии и уровень экспрессии каждой кассеты экспрессии в пакетном векторе.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[08] Настоящее изобретение обеспечивает новые синтезированные области межгенной последовательности или ISR для применения в растениях. В изобретении также предусмотрены конструкции рекомбинантной ДНК, содержащие ISR. Настоящее изобретение также относится к клеткам трансгенного растения, растениям и семенам, содержащим ISR. В одном варианте осуществления ISR вставлены между кассетами экспрессии в пакетном векторе. Настоящее изобретение также предусматривает способы применения ISR и создания и применения конструкций рекомбинантной ДНК, содержащих ISR, и клетки трансгенного растения, растения и семена, содержащие ISR.

[09] Таким образом, в одном аспекте изобретение предусматривает молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO:1-6; и (b) последовательности, включающей любую из SEQ ID NO:1-6. В конкретных вариантах осуществления молекула рекомбинантной ДНК содержит последовательность ДНК, имеющую идентичность последовательности на по меньшей мере около 85 процентов, по меньшей мере около 86 процентов, по меньшей мере около 87 процентов, по меньшей мере около 88 процентов, по меньшей мере около 89 процентов, по меньшей мере около 90 процентов, по меньшей мере 91 процент, по меньшей мере 92 процента, по меньшей мере 93 процента, по меньшей мере 94 процента, по меньшей мере 95 процентов, по меньшей мере 96 процентов, по меньшей мере 97 процентов, по меньшей мере 98 процентов или по меньшей мере 99 процентов последовательности ДНК любой из SEQ ID NO:1-6.

[010] В другом аспекте в данном документе представлены клетки трансгенного растения, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO: 1-6; и (b) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-6. В определенных вариантах осуществления клетка трансгенного растения представляет собой клетку однодольного растения. В других вариантах осуществления клетка трансгенного растения представляет собой клетку однодольного растения или клетку двудольного растения.

[011] В еще одном аспекте в данном документе дополнительно предусмотрено трансгенное растение или его часть, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из: (а) последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO:1-6; и (b) последовательности, включающей любую из SEQ ID NO:1-6. В конкретных вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой потомство растения любого поколения, которое содержит молекулу рекомбинантной ДНК. В данном документе также предусмотрено трансгенное семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, которое обеспечивает такое трансгенное растение при выращивании.

[012] В другом аспекте изобретение относится к способу получения товарного продукта, включающему получение трансгенного растения или его части, содержащих молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению, и получение из него товарного продукта. В одном варианте осуществления товарный продукт представляет собой семена, обработанные семена, белковый концентрат, белковый изолят, крахмал, зерна, части растений, масло из семян, биомассу, муку мелкого помола и муку грубого помола.

[013] В еще одном аспекте изобретение предусматривает способ снижения взаимодействия первой кассеты экспрессии трансгена со второй кассетой экспрессии трансгена в трансгенном растении, трансформированном пакетным вектором, причем указанный способ включает трансформацию растительной клетки пакетным вектором, содержащим рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую: (а) первую трансгенную кассету; (b) вторую трансгенную кассету; (с) молекулу ДНК, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: (i) последовательности с по

меньшей мере 85% идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO:1-6; и (ii) последовательности, включающей любую из SEQ ID NO:1-6; где молекула ДНК вставлена между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии; и (d) регенерацию трансгенного растения из трансформированной клетки растения. В определенных вариантах осуществления пакетный вектор состоит из более чем двух кассет экспрессии. В дополнительных вариантах осуществления молекула ДНК любой из SEQ ID NO:1-6 вставлена между каждой из кассет экспрессии в пакетном векторе.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[014] SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR4_Stop, которая содержит ISR4 (SEQ ID NO:4) и три стоп-кодона на обоих 5' - и 3' -концах.

15 [015] SEQ ID NO:2 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR89.

[016] SEQ ID NO:3 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR2.

[017] SEQ ID NO:4 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR4.

20 [018] SEQ ID NO:5 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR97.

[019] SEQ ID NO:6 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR69

25 [020] SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR88.

[021] SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR86.

[022] SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность ДНК области межгенной последовательности ISR_X.

- [023] SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность ДНК энхансера, E-CaMV.35S.2xA1-B3-1:1:1, представленную на фиг. 1а-с как “E-CaMV.35S.”
- [024] SEQ ID NO:11 представляет собой последовательность ДНК промотора, P-Os.Act1:67, представленную на фиг. 1а-с как “P-Os.Act1.”
- 5 [025] SEQ ID NO:12 представляет собой последовательность ДНК лидерной последовательности или 5' UTR, L-Ta.Lhcb1:1, представленную на фиг. 1а-с как “L-Ta.Lhcb1.”
- [026] SEQ ID NO:13 представляет собой последовательность ДНК интрона, I-Os.Act1-1:1:19, представленную на фиг. 1а-с как “I-Os.Act1.”
- 10 [027] SEQ ID NO:14 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую неомифосфотрансферазу, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3, представленную на фиг. 1а-с как “nptII-1.”
- [028] SEQ ID NO:15 представляет собой последовательность ДНК 3' UTR, T-Ta.Hsp17-1:1:1, представленную на фиг. 1а-с как “T-Ta.Hsp17.”
- 15 [029] SEQ ID NO:16 представляет собой последовательность ДНК промотора, P-Zm.39486-1:1:1, представленную на фиг. 1а-с как “P-Zm.39486.”
- [030] SEQ ID NO:17 представляет собой последовательность ДНК лидерной последовательности или 5' UTR, L-Zm.39486-1:1:1, представленную на фиг. 1а-с как “L-Zm.39486.”
- 20 [031] SEQ ID NO:18 представляет собой последовательность ДНК интрона, I-Zm.DnaK:1, представленную на фиг. 1а-с как “I-Zm.DnaK.”
- [032] SEQ ID NO:19 представляет собой последовательность ДНК синтезированной кодирующей последовательности, оптимизированной для экспрессии растения для β-глюкуронидазы (GUS-1: GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1), с процессируемым интроном, полученным из тканеспецифичного индуцируемого светом гена ST-LS1 картофеля (доступ Genbank: X04753), представленную на фиг. 1а-с как “GUS-1.”
- 25 [033] SEQ ID NO:20 представляет собой последовательность ДНК 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1, представленную на фиг. 1а-с как “T-Os.Mth.”
- [034] SEQ ID NO:21 представляет собой последовательность ДНК промотора, P-FMV.35S-enh-1:1:2, представленную на фиг. 2а-с как “P-FMV.35S.”
- 30

[035] SEQ ID NO:22 представляет собой последовательность ДНК лидерной последовательности или 5' UTR, L-Ph.DnaK-1:1:3, представленную на фиг. 2а-с как "L-Ph.DnaK."

5 [036] SEQ ID NO:23 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую неомицинофосфотрансферазу, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:2, представленную на фиг. 2а-с как "nptII-2."

[037] SEQ ID NO:24 представляет собой последовательность ДНК 3' UTR, T-Mt.AC139600v16:1, представленную на фиг. 2а-с как "T-AC139600."

10 [038] SEQ ID NO:25 представляет собой последовательность ДНК промотора, P-Gm.Sphas1:14, представленную на фиг. 2а-с как "P-Gm.Sphas."

[039] SEQ ID NO:26 представляет собой последовательность ДНК лидерной последовательности или 5' UTR, L-Gm.Sphas1-1:1:1, представленную на фиг. 2а-с в виде "L-Gm.Sphas."

15 [040] SEQ ID NO:27 представляет собой последовательность ДНК синтезированной кодирующей последовательности β-глюкуронидазы (GUS-2: GOI-GUS:1:2) с процессируемым интроном, полученным из тканеспецифичного индуцируемого светом гена ST-LS1 картофеля (доступ Genbank: X04753), представленную на фиг. 2а-с как "GUS-2."

20 [041] SEQ ID NO:28 представляет собой последовательность ДНК 3' UTR, T-Mt.AC145767v28:3, представленную на фиг. 2а-с как "T- AC145767."

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

25 [042] На фиг. 1а-с представлены схематические изображения пакетных векторов, используемых для анализа эффективности синтезированных областей межгенной последовательности («ISR») в снижении взаимодействия двух трансгенных кассет экспрессии в одном пакетном векторе на экспрессию друг друга в стабильно трансформированных растениях кукурузы. Ссылочные позиции на графических материалах указывают соответствующий идентификатор последовательности для каждого генетического элемента, как представлено в кратком описании

30 последовательностей. На фиг. 1а показана конфигурация трансгенной кассеты экспрессии для контрольного пакетного вектора, контроль без энхансера. Контроль без

энхансера состоит из двух трансгенных кассет экспрессии, клонированных в противоположном направлении. Первая трансгенная кассета состоит из промотора P-Os.Act1:67 (SEQ ID NO:11), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ta.Lhcb1:1 (SEQ ID NO:12), функционально связанного 5'-
5 концом с интроном, I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO:13), функционально связанного 5'-
концом с кодирующей последовательностью неомидинфосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3 (SEQ ID NO:14), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Ta.Hsp17-1:1:1 (SEQ ID NO:15). Вторая трансгенная кассета, клонированная в противоположном направлении по отношению к первой трансгенной кассете, состоит из специфичного
10 для семян промотора P-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:16), функционально связанного 5'-
концом с лидерной последовательностью, L-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:17), функционально связанного 5'-концом с интроном, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:18), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-1, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1 (SEQ ID NO:19), функционально
15 связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:20). На фиг. 1b показана конфигурация трансгенной кассеты экспрессии для контрольного пакетного вектора, контроль с энхансером. Контроль с энхансером состоит из сильного энхансера E-CaMV.35S.2xA1-B3-1:1:1 (SEQ ID NO:10), содержащего тандемные повторы конкретных областей энхансера, полученных из промотора 35S вируса мозаики
20 цветной капусты, функционально связанного 5'-концом с промотором, P-Os.Act1:67 (SEQ ID NO:11), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ta.Lhcb1:1 (SEQ ID NO:12), функционально связанного 5'-
концом с интроном, I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO:13), функционально связанного 5'-
концом с кодирующей последовательностью неомидинфосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3 (SEQ ID NO:14), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Ta.Hsp17-1:1:1 (SEQ ID NO:15). Вторая трансгенная кассета, клонированная в противоположном
25 направлении по отношению к первой трансгенной кассете, состоит из специфичного для семян промотора P-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:16), функционально связанного 5'-
концом с лидерной последовательностью, L-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:17), функционально связанного 5'-концом с интроном, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:18), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-1, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1 (SEQ ID NO:19), функционально
30 связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:20). В контроле с энхансером на фиг. 1a отсутствует ISR между первой и второй трансгенными кассетами

экспрессии. В результате энхансер из первой трансгенной кассеты экспрессии взаимодействует с экспрессией специфичного для семян промотора во второй трансгенной кассете экспрессии и изменяет ее, изменяя экспрессию второй трансгенной кассеты экспрессии со специфичной для семян на конститутивную. На фиг. 1с ISR клонирована между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии контроля с энхансером. Если ISR эффективна, то она будет снижать взаимодействие энхансера в первой трансгенной кассете экспрессии с экспрессией промотора во второй трансгенной кассете экспрессии, снижая экспрессию в тканях, отличных от семян, по сравнению с контролем с энхансером.

5 [043] На фиг. 2а-с представлено схематическое изображение пакетных векторов, используемых для анализа эффективности ISR в снижении взаимодействия двух трансгенных кассет экспрессии в одном наборе векторов на экспрессию друг друга в стабильно трансформированных растениях сои. Ссылочные позиции на графических материалах указывают соответствующий идентификатор последовательности для

15 каждого генетического элемента, как представлено в кратком описании последовательностей. На фиг. 2а показана конфигурация трансгенной кассеты экспрессии для контрольного пакетного вектора, контроль без энхансера. Контроль без энхансера (фиг. 2а) состоит из промотора, специфичного для семян, P-Gm.Sphas1:14 (SEQ ID NO:25), функционально связанного 5'-концом с лидерной

20 последовательностью, L-Gm.Sphas1-1:1:1 (SEQ ID NO:26), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-2, GOI-GUS:1:2 (SEQ ID NO:27), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Mt.AC145767v28:3 (SEQ ID NO:28). Специфичный для семян промотор может активировать экспрессию GUS преимущественно в семенах растения сои в контроле без энхансера. На фиг. 2б

25 показана конфигурация трансгенной кассеты экспрессии для контрольного пакетного вектора, контроль с энхансером. Контроль с энхансером состоит из двух трансгенных кассет экспрессии в противоположном направлении. Первая трансгенная кассета состоит из сильного промотора, полученного из промотора 35S вируса мозаики норичника, с перегруппированным и дублицированным энхансером, P-FMV.35S-enh-

30 1:1:2 (SEQ ID NO:21), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ph.DnaK-1:1:3 (SEQ ID NO:22), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью неамицинофосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:2 (SEQ ID NO:23), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Mt.AC139600v16:1 (SEQ ID NO:24). Вторая трансгенная кассета, клонированная в

противоположном направлении по отношению к первой трансгенной кассете, состоит из специфичного для семян промотора, P-Gm.Sphas1:14 (SEQ ID NO:25), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Gm.Sphas1-1:1:1 (SEQ ID NO:26), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-2, GOI-GUS:1:2 (SEQ ID NO:27), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Mt.AC145767v28:3 (SEQ ID NO:28). В контроле с энхансером отсутствует ISR между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии. В результате на экспрессию специфичного для семян промотора во второй трансгенной кассете экспрессии влияет область энхансера промотора 35S вируса мозаики норичника в первой трансгенной кассете экспрессии, изменяя экспрессию второй трансгенной кассеты экспрессии со специфичной для семян на конститутивную. На фиг. 2с ISR клонирована между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии контроля с энхансером. Если ISR эффективна, то она будет снижать взаимодействие области энхансера промотора 35S вируса мозаики норичника в первой трансгенной кассете экспрессии с промотором во второй трансгенной кассете экспрессии, снижая экспрессию в тканях, отличных от семян, по сравнению с контролем с энхансером.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[044] Настоящее изобретение относится к новым синтезированным областям межгенной последовательности («ISR») для применения в трансгенных растениях. Нуклеотидные последовательности этих новых синтезированных ISR представлены под SEQ ID NO:1-6. Эти синтезированные ISR уменьшают взаимодействие элементов экспрессии в первой трансгенной кассете экспрессии с экспрессией второй трансгенной кассеты в трансгенном растении при вставке между первой трансгенной кассетой и вторым трансгеном. Настоящее изобретение также относится к клеткам трансгенного растения, растениям и семенам, содержащим ISR. Изобретение также относится к способам применения ISR и получения и применения молекул рекомбинантной ДНК, содержащих ISR.

[045] Следующие определения и способы предназначены для лучшего определения настоящего изобретения и руководства для специалистов в данной области техники при практическом применении настоящего изобретения. Если не указано иное, термины

следует понимать в соответствии с общепринятым использованием специалистами в соответствующей области техники.

ISR и взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии

5 [046] Как используется в данном документе, термин «взаимодействие» относится к влиянию одного или более элементов в первой трансгенной кассете экспрессии на профиль экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии, когда они находятся в непосредственной близости друг от друга в трансгенном растении, в определенных вариантах осуществления они были трансформированы с использованием пакетного
10 вектора.

[047] Регуляторные элементы в каждой трансгенной кассете экспрессии состоят из различных цис-элементов, которые связаны действующими в транс-положении факторами, влияющими на транскрипцию трансгена. Например, растительный промотор состоит из цис-элементов, которые необходимы для инициации
15 транскрипции и эффективности транскрипции. Кроме того, растительный промотор часто состоит из других мотивов цис-элементов, которые могут модулировать транскрипцию в ответ на определенный раздражитель, такой как стресс (ABRE и AB14), патоген (W Box) или свет (GT1-мотив). Другие цис-элементы могут обеспечивать тканеспецифичную или тканепредпочтительную экспрессию (*Porto et al.*
20 *(2014) Plant Promoters: An Approach of Structure and Function. Mol. Biotechnol* 56: 38-49). Например, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты содержит область энхансера, состоящую из двух доменов. Нижний домен, домен А, обеспечивает экспрессию главным образом в корнях. Цис-элемент в области из двадцати двух пар оснований в домене А в первую очередь отвечает за эту экспрессию. Верхний домен,
25 домен В, обеспечивает экспрессию в большинстве типов клеток листа и стебля, а также в сосудистой ткани корней (*Benfey et al. (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. The EMBO Journal, 9:1677-1684*).

[048] Когда две кассеты экспрессии трансгена смежные друг с другом в геноме
30 растения, существует возможность того, что элементы экспрессии одной трансгенной кассеты экспрессии изменят экспрессию другой трансгенной кассеты экспрессии. Это «взаимодействие» одной трансгенной кассеты экспрессии со смежной трансгенной

кассетой экспрессии в трансгенных растениях продемонстрировано в примерах 2 и 3 с помощью контроля с энхансером.

5 [049] «Утечка» — это термин, используемый для описания уровня изменения средней экспрессии в тканях, вызванного взаимодействием элементов экспрессии в первой кассете экспрессии с профилем экспрессии второй кассеты экспрессии. Утечка определяется путем сравнения профиля экспрессии контроля с энхансером с профилем экспрессии тестового пакетного вектора с ISR (который состоит из контроля с энхансером с ISR, вставленным между двумя трансгенными кассетами). Утечка контроля без энхансера по сравнению с контролем с энхансером составляет 100%.
10 Утечка конструкций, содержащих ISR, определяется путем деления средней экспрессии GUS в нецелевых тканях в тестовой конструкции на среднюю экспрессию GUS в нецелевых тканях конструкции контроля с энхансером и умножения на сто. Процент снижения утечки определяется путем вычитания процента герметичности из ста процентов.

15 [050] «Область межгенной последовательности» или «ISR» представляет собой синтезированную нуклеотидную последовательность, которая предназначена для минимизации взаимодействия элементов экспрессии в соседних трансгенных кассетах на экспрессию друг друга. Раскрытые в данном документе области межгенных последовательностей были разработаны с помощью вычислений и проанализированы
20 на способность снижать взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии в пакетном векторе, используемом для трансформации растительных клеток, таким образом, сохраняя профиль экспрессии каждой трансгенной кассеты экспрессии при отдельном наблюдении в трансгенном растении.

25 [051] «Синтезированная нуклеотидная последовательность» или «искусственная нуклеотидная последовательность» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, как известно, не встречается в природе или не встречается в природе. Элементы области межгенной последовательности по
30 настоящему изобретению содержат синтезированные нуклеотидные последовательности. Предпочтительно, чтобы синтезированные нуклеотидные последовательности имели небольшую расширенную гомологию с природными последовательностями или вообще не имели ее. Расширенная гомология в этом

контексте обычно относится к 100% идентичности последовательности, выходящей за пределы около 25 нуклеотидов непрерывной последовательности.

[052] В примере 2 контрольные растения кукурузы трансформировали с использованием двух пакетных векторов, состоящих из двух трансгенных кассет экспрессии с противоположным направлением. Один контрольный пакетный вектор содержал первую трансгенную кассету экспрессии, содержащую один промотор актина риса (контроль без энхансера, см. фиг. 1a), управляющий экспрессией гена устойчивости к антибиотикам, и вторую трансгенную кассету экспрессии, содержащую предпочтительный для семян промотор, управляющий экспрессией GUS. Растения кукурузы, трансформированные этим пакетным вектором, демонстрировали предпочтительную для семян экспрессию GUS. Другой контрольный пакетный вектор (контроль с энхансером) содержал первую трансгенную кассету экспрессии, содержащую сильный энхансер, полученный из CaMV 35S, функционально связанного с одним промотором актина риса, управляющим экспрессией гена устойчивости к антибиотикам, и вторую трансгенную кассету экспрессии, которая содержала предпочтительный для семян промотор, управляющий экспрессией GUS. Растения кукурузы, трансформированные контролем с энхансером, демонстрировали высокие уровни экспрессии GUS в корнях, листьях, пыльниках, кисти нитей рыльца и семенах. Таким образом, в контроле с энхансером первый энхансер трансгенной кассеты экспрессии модифицировал профиль экспрессии профиля экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии, изменяя экспрессию второй трансгенной кассеты экспрессии с предпочтительной для семян на конститутивную.

[053] Определенные сконструированные путем вычислений ISR были вставлены между первой и второй трансгенными кассетами контроля с энхансером, как показано на фиг 1c. Процент утечки во взаимодействии профиля экспрессии первой трансгенной кассеты экспрессии с профилем экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии составлял 16%, 8% и 6% соответственно, когда ISR4_Stop (SEQ ID NO:1), ISR89 (SEQ ID NO:2) и ISR97 (SEQ ID NO:5) были вставлены между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии. Таким образом, эти ISR уменьшали взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии на 84%, 92% и 94% соответственно.

[054] В примере 3 аналогичная схема эксперимента использовалась для проверки эффективности некоторых ISR на растениях сои. Вставка ISR2 (SEQ ID NO:3), ISR4

(SEQ ID NO:4), ISR69 (SEQ ID NO:6) между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии контроля с энхансером приводила к снижению влияния профиля экспрессии первой трансгенной кассеты экспрессии на профиль экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии с утечкой только 3%, 4% и 5% соответственно. Это привело к уменьшению взаимодействия элементов экспрессии в первой трансгенной кассете экспрессии с профилем экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии на 97%, 96% и 95% соответственно.

[055] Как показано в примерах, не все области межгенной последовательности, сконструированные с помощью вычислений, были столь же эффективны в уменьшении взаимодействия. Кроме того, даже ISR, которые привели к уменьшению взаимодействия, привели к этому в разной степени. Например, ISR88 (SEQ ID NO:7) и ISR86 (SEQ ID NO:8) уменьшали взаимодействие только на 39% и 68%, соответственно, в трансгенных растениях кукурузы с утечкой 61% и 32% соответственно. Это снижение взаимодействия было намного меньше по сравнению с 84% для ISR4_Stop, 92% для ISR89 и 94% для ISR97. Аналогично, у трансгенных растений сои ISR_X (SEQ ID NO:9) снижала взаимодействие только на 76% (процент утечки 24%) по сравнению с 97% для ISR2, 96% для ISR4 и 95% для ISR69. Таким образом, каждая ISR, созданная с помощью вычислений, уникальна, и разные ISR можно использовать в комбинации с разными кассетами экспрессии для достижения желаемых профилей экспрессии для одного или нескольких представляющих интерес генов.

Молекулы ДНК

[056] Как используется в данном документе, термин «ДНК» или «молекула ДНК» относится к двухцепочечной молекуле ДНК геномного или синтетического происхождения, *т. е.* полимеру дезоксирибонуклеотидных оснований или молекуле ДНК, считываемой с 5'-конца (выше) до 3'-конца (ниже). Как используется в данном документе, термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Используемая в данном документе терминология соответствует терминологии раздела 37 Свода федеральных правил США, § 1.822 и изложена в таблицах стандарта ВОИС ST.25 (1998 г.), приложение 2, таблицы 1 и 3.

[057] Как используется в данном документе, «гетерологичная молекула» представляет собой молекулу, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не могли бы

встречаться вместе в природных условиях без вмешательства человека. Например, гетерологичная молекула 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, которая отличается от последовательностей ДНК, существующих в природе, молекулу ДНК, которая включает синтезированную последовательность ДНК, или молекулу ДНК, которая была включена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генов.

[058] Ссылка в этой заявке на «выделенную молекулу ДНК» или эквивалентный термин или фразу предназначена для обозначения того, что молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не в своем природном окружении. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и т.п., которые природным образом присутствуют в ДНК генома организма, не считаются «выделенными» при условии, что элемент находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природных условиях. Однако каждый из этих элементов и подчасти этих элементов будут «выделены» в рамках настоящего раскрытия, если элемент не находится в геноме организма и в том месте генома, в котором он встречается в природных условиях. Подобным образом, нуклеотидная последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет выделенной нуклеотидной последовательностью, если эта нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, из которой в природе обнаружена последовательность, кодирующая белок. Синтезированная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность встречающегося в природе инсектицидного белка, будет считаться выделенной для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего раскрытия любая трансгенная нуклеотидная последовательность, т. е. нуклеотидная последовательность ДНК, встроенная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она в плазмиде или аналогичной 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.

5 [059] Как используется в данном документе, термин «идентичность последовательностей» относится к степени идентичности двух оптимально выровненных полинуклеотидных последовательностей или двух оптимально выровненных полипептидных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей создается путем ручного выравнивания двух последовательностей, например, эталонной последовательности и другой последовательности, чтобы максимально увеличить количество совпадений нуклеотидов в выравнивании последовательностей с соответствующими внутренними нуклеотидными вставками, делециями или гэпами. Как используется в данном документе, термин «эталонная последовательность» относится к последовательности ДНК, представленной под SEQ ID NO: 1-6.

15 [060] Как используется в данном документе, термин «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности» или «% идентичности» представляет собой долю идентичности, умноженную на 100. «Доля идентичности» для последовательности, оптимально выровненной с эталонной последовательностью, представляет собой количество совпадений нуклеотидов в оптимальном выравнивании, разделенное на общее количество нуклеотидов в эталонной последовательности, например, общее количество нуклеотидов в полной длине всей эталонной последовательности. Таким образом, один вариант осуществления изобретения предусматривает молекулу ДНК, содержащую последовательность, которая при оптимальном выравнивании с эталонной последовательностью, представленной в данном документе под SEQ ID NO: 1-6, имеет по меньшей мере около 85 процентов идентичности, по меньшей мере около 86 процентов идентичности, по меньшей мере около 87 процентов идентичности, по меньшей мере около 88 процентов идентичности, по меньшей мере около 89 процентов идентичности, по меньшей мере около 90 процентов идентичности, по меньшей мере около 91 процента идентичности, по 25 меньшей мере около 92 процентов идентичности, по меньшей мере около 93 процентов идентичности, по меньшей мере около 94 процентов идентичности, по меньшей мере около 95 процентов идентичности, по меньшей мере около 96 процентов идентичности, по меньшей мере около 97 процентов идентичности, по меньшей мере около 98

процентов идентичности, по меньшей мере около 99 процентов идентичности или по меньшей мере около 100 процентов идентичности эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления последовательность, имеющая заданный процент идентичности любой из SEQ ID NO: 1-6, сохраняет общую функциональность любой из SEQ ID NO: 1-6, т. е. проявляет такую же или аналогичную способность снижать влияние первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию трансгенной второй кассеты в трансгенном растении. В некоторых вариантах осуществления последовательность, имеющая заданный процент идентичности любой из SEQ ID NO: 1-6, обладает активностью любой из SEQ ID NO: 1-6 в отношении уменьшения влияния первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенном растении.

Регуляторные элементы

[061] Регуляторные элементы, такие как промоторы, лидерные последовательности (также известные как 5' UTR), энхансеры, интроны и области терминации транскрипции (или 3' UTR), играют неотъемлемую роль в общей экспрессии генов в живых клетках. Термин «регуляторный элемент», используемый в данном документе, относится к молекуле ДНК, обладающей активностью, регулирующей ген. Термин «активность, регулирующая ген», 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, лидерные последовательности, энхансеры, интроны и 3' UTR, которые функционируют в растениях, пригодны для модификации фенотипов растений с помощью генной инженерии.

[062] Регуляторные элементы могут характеризоваться их профилем экспрессии генов, например, положительными и/или отрицательными эффектами, такими как конститутивная экспрессия или временная, пространственная, связанная с развитием, тканевая, экологическая, физиологическая, патологическая экспрессия, клеточный цикл и/или химически реагирующая экспрессия, а также любые их комбинации, а также количественными или качественными признаками. Как используется в данном документе, термин «профиль экспрессии гена» представляет собой любой профиль транскрипции функционально связанной молекулы ДНК в транскрибируемую молекулу РНК. Транскрибируемая молекула РНК может быть транслирована с

образованием молекулы белка или может обеспечить антисмысловую или другую регуляторную молекулу РНК, такую как двухцепочечная РНК (дцРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), микроРНК (микроРНК), малая интерферирующая РНК (миРНК) и т.п.

5 [063] Как используется в данном документе, термин «экспрессия белка» представляет собой любой профиль трансляции транскрибируемой молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессия белка может характеризоваться его временными, пространственными, связанными с развитием или морфологическими качествами, а также количественными или качественными показателями.

10 [064] Промотор можно использовать в качестве регуляторного элемента для модулирования экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Как используется в данном документе, термин «промотор» обычно относится к молекуле ДНК, которая участвует в распознавании и связывании РНК-полимеразы II и других белков, таких как действующие в транс-положении факторы транскрипции, для
15 инициации транскрипции. Промотор может быть первоначально выделен из 5'-нетранслируемой области (5' UTR) геномной копии гена. Альтернативно, промоторы могут представлять собой полученные путем синтеза или обработанные молекулы ДНК. Промоторы также могут быть химерными. Химерные промоторы получают путем слияния двух или нескольких гетерологичных молекул ДНК. Промоторы,
20 пригодные для демонстрации настоящего изобретения, включают промоторные элементы, представленные под SEQ ID NO: 11, 16, 21 и 25.

[065] Как используется в данном документе, термин «лидерная последовательность» относится к молекуле ДНК, выделенной из нетранслируемой 5'-области (5' UTR) гена и определяемой, как правило, как нуклеотидный сегмент между сайтом начала
25 транскрипции (TSS) и сайтом начала последовательности, кодирующей белок. Альтернативно, лидерные последовательности могут представлять собой полученные синтезом или регулируемые элементы ДНК. Лидерную последовательность можно использовать в качестве 5' регуляторного элемента для модулирования экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Лидерные молекулы
30 можно использовать с гетерологичным промотором или с их нативным промотором. Лидерные последовательности, пригодные для демонстрации настоящего изобретения, включают SEQ ID NO: 12, 17, 22 и 26.

[066] Как используется в данном документе, термин «интрон» относится к молекуле ДНК, которая может быть выделена или идентифицирована из гена, и может быть определена в целом как область, сплайсированная во время обработки матричной РНК (мРНК) перед трансляцией. Альтернативно, интрон может представлять собой полученный синтезом или регулируемый элемент ДНК. Интрон может содержать энхансерные элементы, влияющие на транскрипцию функционально связанных генов. Интрон можно использовать в качестве регуляторного элемента для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. Конструкция может содержать интрон, причем интрон может быть или не быть гетерологичным по отношению к транскрибируемой молекуле ДНК. Интроны, используемые для демонстрации настоящего изобретения, представлены под SEQ ID NO:13 и 18.

[067] Как используется в данном документе, термины «3'-молекула терминации транскрипции», «3'-нетранслируемая область» или «3' UTR» относятся к молекуле ДНК, которая используется во время транскрипции в нетранслируемой области 3'-части молекулы мРНК. 3'-нетранслируемая область молекулы мРНК может быть получена путем специфичного расщепления и 3'-полиаденилирования, также известного как полиА-хвост. 3' UTR может быть функционально связана с транскрибируемой молекулой ДНК и располагаться ниже транскрибируемой молекулы ДНК и может включать сигнал полиаденилирования и другие регуляторные сигналы, способные влиять на транскрипцию, обработку мРНК или экспрессию генов. Считается, что полиА-хвосты участвуют в обеспечении стабильности мРНК и в инициации трансляции.

[068] Как используется в данном документе, термин «энхансер» или «энхансерный элемент» относится к действующему в *цис*-положении регуляторному элементу, также известному как *цис*-элемент, который придает аспект общего профиля экспрессии, но обычно сам по себе недостаточен для управления транскрипцией функционально связанной транскрибируемой молекулы ДНК. В отличие от промоторов, энхансерные элементы обычно не включают сайт начала транскрипции (TSS) или ТАТА-бокс или эквивалентную последовательность ДНК.. Промотор или фрагмент промотора может природным образом содержать один или несколько энхансерных элементов, влияющих на транскрипцию функционально связанной последовательности ДНК.. Энхансерный элемент также может быть слит с промотором с образованием *цис*-элемента химерного промотора, который придает аспект общей модуляции экспрессии гена.

[069] Как используется в данном документе, термин «вариант» относится ко второй молекуле ДНК, которая по составу похожа, но не идентична первой молекуле ДНК. Например, вариант одной из ISR, раскрытых в данном документе, будет иметь несколько иной состав последовательности, но будет сохранять способность уменьшать влияние первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенном растении таким же образом, как ISR, из которого она была получена. Вариант может представлять собой более короткую или укороченную версию первой молекулы ДНК или измененную версию последовательности первой молекулы ДНК, например, с другими сайтами рестрикционных ферментов и/или внутренними делециями, заменами или вставками. «Вариант» также может охватывать ISR, имеющую нуклеотидную последовательность, содержащую замену, делецию или вставку одного или нескольких нуклеотидов эталонной последовательности, где производный элемент межгенной области последовательности имеет большую или меньшую или эквивалентную способность уменьшать влияние первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенном растении. В настоящем изобретении полинуклеотидная последовательность, представленная под SEQ ID NO:1-6, может быть использована для создания вариантов, сходных по составу, но не идентичных последовательности ДНК исходной ISR, при сохранении общей функциональности, т.е. такая же или подобная способность снижать влияние первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенном растении. В определенных вариантах осуществления вариант любой из SEQ ID NO: 1-6 обладает активностью любой из SEQ ID NO: 1-6 в отношении снижения влияния первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенное растение. Получение таких вариантов изобретения находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники в свете раскрытия и входит в объем изобретения.

[070] В некоторых примерах вариант ISR может представлять собой фрагмент любой из SEQ ID NO:1-6. Фрагменты SEQ ID NO:1-6 могут содержать по меньшей мере около 50 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 100 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 150 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 200 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 250 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 300 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 350 смежных нуклеотидов, по

меньшей мере около 400 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 450 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 500 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 550 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 600 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 650 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 700 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 750 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 800 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 850 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 900 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 950 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1000 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1100 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1200 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1300 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1400 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1500 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1600 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1700 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1800 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 1900 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2000 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2100 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2200 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2300 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2400 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2500 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2600 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2700 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2800 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 2900 смежных нуклеотидов, по меньшей мере около 3000 смежных нуклеотидов или более любой из SEQ ID NO:1-6. В определенных вариантах осуществления фрагмент любой из SEQ ID NO: 1-6 обладает активностью любой из SEQ ID NO: 1-6 в отношении снижения влияния первой трансгенной кассеты экспрессии на экспрессию второй трансгенной кассеты в трансгенное растение.

Конструкции

[071] Как используется в данном документе, термин «конструкция» означает любую рекомбинантную молекулу ДНК, такую как плаزمид, космида, вирус, фаг, или линейная или кольцевая молекула ДНК или РНК, полученная из любого источника, способная к геномной интеграции или автономной репликации, содержащего молекулу ДНК, в которой по меньшей мере одна молекула ДНК функционально соединена с другой молекулой ДНК, т.е. функционально связана. Как используется в данном документе, термин «вектор» означает любую конструкцию, которая может

использоваться с целью трансформации, то есть введения гетерологичной ДНК или РНК в клетку-хозяин. «Пакетный вектор» представляет собой вектор, состоящий из двух или более кассет, объединенных вместе для трансформации. Две или более транскрипционных кассет экспрессии в пакетном векторе разделены фрагментами последовательности ДНК, длина которых может составлять от около 10 нуклеотидов до около нескольких сотен нуклеотидов, или нескольких тысяч нуклеотидов, или более, в зависимости от метода клонирования или синтеза, который был использован для построения пакетного вектора. Используемый в данном документе термин «кассета экспрессии» относится к молекуле ДНК, содержащей по меньшей мере транскрибируемую молекулу ДНК, функционально связанную с одним или несколькими регуляторными элементами, как правило, по меньшей мере с промотором и 3' UTR.

[072] Как используется в данном документе, термин «функционально связанный» относится к первой молекуле ДНК, присоединенной ко второй молекуле ДНК, где первая и вторая молекулы ДНК расположены таким образом, что первая молекула ДНК влияет на функцию второй молекулы ДНК. Две молекулы ДНК могут быть или не быть частью одной смежной молекулы ДНК и могут быть или не быть смежными. Например, промотор функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, если промотор модулирует транскрипцию представляющей интерес транскрибируемой молекулы ДНК в клетке. Например, лидерная последовательность функционально связана с последовательностью ДНК, когда она может влиять на транскрипцию или трансляцию последовательности ДНК.

[073] В данной области техники известны способы сборки и введения конструкций в клетку таким образом, чтобы транскрибируемая молекула ДНК транскрибировалась в функциональную молекулу мРНК, которая транслируется и экспрессируется как белок. Для практического применения изобретения традиционные композиции и способы получения и использования конструкций и клеток-хозяев хорошо известны специалистам в данной области техники. Типичные векторы, подходящие для экспрессии нуклеиновых кислот в высших растениях, хорошо известны в данной области техники и включают векторы, полученные из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* и вектора контроля переноса pCaMV_{35S}.

[074] В конструкцию могут быть включены различные регуляторные элементы, включая любые из представленных в данном документе. Любые такие регуляторные

элементы могут быть предоставлены в комбинации с другими регуляторными элементами. Такие комбинации могут быть разработаны или модифицированы для получения необходимых регуляторных свойств. В одном варианте осуществления конструкции по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один регуляторный элемент, функционально связанный с транскрибируемой молекулой ДНК, функционально связанной с 3' UTR.

[075] Конструкции по настоящему изобретению могут включать любой промотор или лидерную последовательность, представленные в данном документе или известные в данной области. Например, промотор по изобретению может быть функционально связан с гетерологичной нетранслируемой 5'-лидерной последовательностью, такой как лидерная последовательность, полученная из гена белка теплового шока. Альтернативно лидерная последовательность по изобретению может быть функционально связана с гетерологичным промотором, таким как промотор транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты.

15 **Транскрибируемые молекулы ДНК**

[076] Как используется в данном документе, термин «транскрибируемая молекула ДНК» относится к любой молекуле ДНК, способной транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые имеют последовательности, кодирующие белок, и те, которые продуцируют молекулы РНК, имеющие последовательности, подходящие для супрессии гена. Тип молекулы ДНК может включать, помимо прочего, молекулу ДНК того же растения, молекулу ДНК другого растения, молекулу ДНК другого организма или синтетическую молекулу ДНК, такую как молекула ДНК, содержащая антисмысловый сигнал гена, или молекула ДНК, кодирующая искусственную, синтетическую или иным образом модифицированную версию трансгена. Типичные транскрибируемые молекулы ДНК для включения в конструкции по изобретению включают, *например*, молекулы ДНК или гены видов, отличных от видов, в которые введена молекула ДНК, или генов, происходящих из или присутствующих в тех же видах, но введены в клетки-реципиенты методами генной инженерии, а не классическими методами селекции.

30 [077] «Трансген» относится к транскрибируемой молекуле ДНК, гетерологичной 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 настоящем или любом предыдущем поколении клетки. В определенных вариантах осуществления трансген содержит ген, представляющий агрономический интерес, такой как ген, способный обеспечивать устойчивость растений к гербицидам, или ген, способный обеспечивать устойчивость растений к вредителям.

5
[078] Регуляторный элемент, такой как промотор, может быть функционально связан с транскрибируемой молекулой ДНК, гетерологичной по отношению к регуляторному элементу. Используемый в данном документе термин «гетерологичный» относится к комбинации двух или более молекул ДНК, когда такая комбинация обычно не встречается в природе. Например, две молекулы ДНК могут происходить от разных видов и/или две молекулы ДНК могут происходить от разных генов, *например*, разных генов одного и того же вида или одних и тех же генов разных видов. Таким образом, регуляторный элемент является гетерологичным по отношению к функционально связанной транскрибируемой молекуле ДНК, если такая комбинация обычно не встречается в природе, то есть транскрибируемая молекула ДНК не встречается в природе функционально связанной с регуляторным элементом.

10
15
[079] Используемый в данном документе термин «рекомбинантная молекула ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не могли бы встречаться вместе в природе без вмешательства человека. Например, рекомбинантная молекула 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, которая отличается от последовательностей ДНК, существующих в природе, молекулу ДНК, которая включает синтезированную последовательность ДНК, или молекулу ДНК, которая была включена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования генов.

20
25
30
[080] Транскрибируемая молекула ДНК, как правило, может представлять собой любую молекулу ДНК, для которой желательна экспрессия транскрипта. Такая экспрессия транскрипта может привести к трансляции полученной молекулы мРНК и, таким образом, к экспрессии белка. В качестве альтернативы, например, транскрибируемая молекула ДНК может быть сконструирована так, чтобы в конечном итоге вызвать снижение экспрессии определенного гена или белка. В одном варианте осуществления этого можно достичь с помощью транскрибируемой молекулы ДНК,

ориентированной в антисмысловом направлении. Специалист в данной области техники знаком с использованием такой антисмысловой технологии. Любой ген может быть отрицательно отрегулирован таким образом, и в одном варианте осуществления транскрибируемая молекула ДНК может быть сконструирована для супрессии конкретного гена посредством экспрессии молекулы дцРНК, миРНК или микроРНК.

Селектируемые маркеры

[081] Трансгены селектируемых маркеров также можно использовать с регуляторными элементами по изобретению. Используемый в данном документе термин «трансген селектируемого маркера» относится к любой транскрибируемой молекуле ДНК, экспрессию которой в трансгенном растении, ткани или клетке или ее отсутствие можно каким-либо образом подвергнуть скринингу или оценить. Селектируемые маркерные гены и связанные с ними методы селекции и скрининга для использования при практическом осуществлении изобретения известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, транскрибируемые молекулы ДНК, кодирующие β -глюкуронидазу (GUS), зеленый флуоресцентный белок (GFP), белки, придающие устойчивость к антибиотикам, и белки, придающие устойчивость к гербицидам. Примеры трансгенов селектируемых маркеров представлены под SEQ ID NO:18 и 26.

Трансформация клеток

[082] Изобретение также направлено на способ получения трансформированных клеток и растений, которые содержат один или несколько регуляторных элементов, функционально связанных с транскрибируемой молекулой ДНК.

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

[084] Как используется в данном документе термин «трансформированный» относится к клетке, ткани, органу или организму, в который была введена чужеродная молекула ДНК, такая как конструкция или пакетный вектор. Введенная молекула ДНК может быть вставлена в геномную ДНК реципиентных клетки, ткани, органа или

организма таким образом, что введенная молекула ДНК наследуется последующим потомством. «Трансгенная» или «трансформированная» клетка или организм может также включать потомство клетки или организма и потомство, полученное в результате программы скрещивания, в которой такой трансгенный организм используется в качестве родителя в скрещивании и проявляет измененный фенотип в результате присутствия чужеродной молекулы ДНК. Введенная молекула ДНК также может временно вводиться в клетку-реципиент, так что введенная молекула ДНК не наследуется последующим потомством. Термин «трансгенный» относится к бактерии, грибку или растению, содержащему одну или несколько гетерологичных молекул ДНК.

5 [085] Специалистам в данной области техники хорошо известно много способов введения молекул ДНК в клетки растений. Процесс обычно включает этапы выбора подходящей клетки-хозяина, трансформации клетки-хозяина вектором и получения трансформированной клетки-хозяина. Способы и материалы для трансформации клеток растений путем введения растительной конструкции в геном растения при осуществлении на практике настоящего изобретения могут включать любой из хорошо известных и продемонстрированных способов. Подходящие способы включают, но не ограничиваются ими, бактериальную инфекцию (например, *Agrobacterium*), бинарные ВАС-векторы, прямую доставку ДНК (например, с помощью ПЭГ-опосредованной трансформации, опосредованного высушиванием/ингибированием поглощения ДНК, электропорации, перемешивания с волокнами карбида кремния и ускорения частиц, покрытых ДНК) и редактирование генов (например, системы CRISPR-Cas), среди прочего.

15 [086] Клетки-хозяева могут представлять собой любую клетку или организм, например клетку растения, клетку водоросли, водоросль, клетку гриба, гриб, клетку бактерии или клетку насекомого. В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева и трансформированные клетки могут включать клетки культурных растений.

20 [087] Трансгенное растение впоследствии может быть регенерировано из клетки трансгенного растения по изобретению. Используя обычные методы селекции или самоопыление, из этого трансгенного растения можно получить семена. Такие семена и полученное потомство растения, выращенного из таких семян, будут содержать молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению и, следовательно, будут трансгенными.

25 30

[088] Трансгенные растения по настоящему изобретению могут самоопыляться для получения семян гомозиготных трансгенных растений по настоящему изобретению (гомозиготных по молекуле рекомбинантной ДНК) или скрещиваться с нетрансгенными растениями или другими трансгенными растениями для получения 5 семян для гетерозиготных трансгенных растений по настоящему изобретению (гетерозиготных по рекомбинантной молекуле ДНК). Как гомозиготные, так и гетерозиготные трансгенные растения упоминаются в данном документе как «растения-потомки». Растения-потомки представляют собой трансгенные растения, происходящие от исходного трансгенного растения и содержащие молекулу 10 рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению. Семена, полученные с использованием трансгенного растения по настоящему изобретению, можно собирать и использовать для выращивания поколений трансгенных растений, т.е. растений-потомков по настоящему изобретению, содержащих конструкцию по настоящему изобретению и экспрессирующих ген, представляющий агрономический интерес. 15 Описания способов селекции, которые обычно используются для разных культур, можно найти в одном из нескольких справочных изданий, см., например, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural 20 Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

[089] Трансформированные растения можно анализировать на наличие гена или генов, 25 представляющих интерес, и уровня и/или профиля экспрессии, придаваемых регуляторными элементами по настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники известны многочисленные способы, доступные для анализа трансформированных растений. Например, способы анализа растений включают, но не ограничиваются ими, саузерн-блоттинг или нозерн-блоттинг, подходы на основе ПЦР, 30 биохимические анализы, методы фенотипического скрининга, оценки в условиях эксплуатации и иммунодиагностические анализы. Экспрессию транскрибируемой молекулы ДНК можно измерить с использованием реагентов и методов TaqMan® (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния), как описано производителем, и

времени до порогового цикла ПЦР, определенного с использованием матрицы тестирования TaqMan®. В качестве альтернативы для оценки экспрессии трансгена можно использовать реагенты и методы Invader® (Third Wave Technologies, Мэдисон, Висконсин), описанные производителем.

5 [090] Настоящее изобретение также относится к частям растения по изобретению. Части растений включают, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, клубни, семена, эндосперм, семяпочки и пыльцу. Части растений по изобретению могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми и/или нерегенерируемыми. Настоящее изобретение также включает и предусматривает трансформированные
10 клетки растений, содержащие молекулу ДНК по изобретению. Трансформированные или трансгенные клетки растений по настоящему изобретению включают регенерируемые и/или нерегенерируемые клетки растений.

[091] Настоящее изобретение также относится к товарному продукту, полученному из трансгенного растения или его части, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК по
15 изобретению. Товарные продукты по изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащее последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6. Как используется в данном документе, термин «товарный продукт» относится к любой композиции или продукту, состоящему из материала, полученного из трансгенного растения, семени, клетки растения или части растения,
20 содержащей молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Товарные продукты включают, помимо прочего, переработанные семена, зерна, части растений и муку. Товарный продукт по изобретению будет содержать обнаруживаемое количество ДНК, соответствующее рекомбинантной молекуле ДНК по изобретению. Обнаружение одной или нескольких таких ДНК в образце может быть использовано для определения
25 состава или источника товарного продукта. Можно использовать любой стандартный метод обнаружения молекул ДНК, включая раскрытые в данном документе способы обнаружения.

[092] Настоящее изобретение может быть легче понято со ссылкой на следующие примеры, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для
30 ограничения изобретения, если не указано иное. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что способы, раскрытые в следующих примерах, представляют собой способы, обнаруженные изобретателями, которые хорошо действуют при практическом применении изобретения. Тем не менее, специалисты в

данной области техники должны, в свете настоящего раскрытия, понимать, что многие изменения могут быть внесены в раскрытые конкретные варианты осуществления, и все же получить подобный или аналогичный результат, не отходя от сущности и объема изобретения, поэтому весь материал, изложенный или показанный на прилагаемых графических материалах, следует понимать как иллюстративный, а не как ограничивающий.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Разработка, синтез и клонирование элементов области межгенной последовательности

[093] Элементы синтезированной области межгенной последовательности («ISR») были разработаны посредством вычислений с помощью алгоритмических методов. Каждая ISR была разработана так, чтобы не содержать никаких потенциальных открытых рамок считывания (ORF), которые могут непреднамеренно привести к выработке нежелательных белков после вставки в геном растения. Кроме того, многие из ISR были разработаны так, чтобы содержать стоп-кодоны на 5'- и 3'-концах ISR, расположенные таким образом, чтобы обеспечивать стоп-кодоны во всех шести рамках считывания.

[094] После разработки ISR были химически синтезированы и клонированы между кассетами экспрессии трансгена в гетерологичном пакетном векторе. Было разработано более 100 синтезированных элементов области межгенной последовательности и проанализировано на стабильно трансформированных растениях кукурузы и сои для идентификации тех синтезированных ISR, которые снижают взаимодействие первой трансгенной кассеты и второй трансгенной кассеты.

[095] Некоторые разработанные и протестированные ISR представлены в таблице 1. ISR4_Stop представляет собой вариант ISR4, в котором стоп-кодоны были присоединены к 3'- и 5'-концам ISR4.

Таблица 1. Элементы области синтезированной межгенной последовательности

30

Описание	SEQ ID NO:	Размер (п. о.)	Присутствующие открытые рамки считывания (ORF)	Стоп-кодона во всех 6 рамках считывания
ISR4_Stop	1	1219	Нет	Да
ISR89	2	1024	Нет	Да
ISR2	3	1195	Нет	Нет
ISR4	4	1195	Нет	Нет
ISR97	5	3024	Нет	Да
ISR69	6	1035	Нет	Да
ISR88	7	1024	Нет	Да
ISR86	8	1024	Нет	Да
ISR_X	9	1219	Нет	Да

[096] Синтезированные элементы области межгенной последовательности, представленные как SEQ ID NO: 1-6, продемонстрировали способность снижать взаимодействие первой трансгенной кассеты со второй трансгенной кассетой в пакетном векторе в стабильно трансформированных растениях кукурузы и сои, как представлено в примерах 2 и 3.

Пример 2

10 **Снижение взаимодействия трансгенных кассет экспрессии с помощью ISR4_Stop, ISR89 и ISR97 в стабильно трансформированных растениях кукурузы**

[097] Этот пример демонстрирует способность ISR ISR4_Stop, ISR89 и ISR97 уменьшать взаимодействие трансгенных кассет экспрессии при вставке между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии пакетного вектора, используемого для стабильной трансформации растений кукурузы.

[098] Растения кукурузы трансформировали бинарными пакетными векторами трансформации растений, содержащими две трансгенные кассеты экспрессии в противоположном направлении с ISR между двумя трансгенными кассетами

экспрессии для оценки способности ISR уменьшать взаимодействие трансгенных кассет экспрессии. Два контрольных пакетных вектора также трансформировали в растения кукурузы и тестировали.

[099] Один контрольный пакетный вектор (фиг. 1a, контроль без энхансера) содержал первую трансгенную кассету экспрессии, которая содержала промотор, P-Os.Act1: 67 (SEQ ID NO: 11), функционально связанный 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ta.Lhcb1:1 (SEQ ID NO: 12), функционально связанный 5'-концом с интроном, I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO: 13), функционально связанный 5'-концом с кодирующей последовательностью для неомицинофосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3 (SEQ ID NO: 14), функционально связанный 5'-концом с 3' UTR, T-Ta.Hsp17-1:1:1 (SEQ ID NO: 15). Вторая трансгенная кассета экспрессии, клонированная в противоположном направлении по отношению к первой трансгенной кассете экспрессии, содержала специфичный для семян промотор P-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:16), функционально связанный 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Zm.39486-1:1:1 (SEQ ID NO:17), функционально связанный 5'-концом с интроном, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:18), функционально связанный 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-1, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1 (SEQ ID NO:19), функционально связанная 5' с 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:20). Контрольный пакетный вектор без энхансера также содержал дополнительную трансгенную кассету экспрессии, которую использовали для отбора трансформированных клеток с использованием отбора с помощью глифосата.

[0100] Другой контрольный пакетном векторе (фиг. 1b, контроль с энхансером) содержал первую трансгенную кассету экспрессии, содержащую сильный энхансер, E-SaMV.35S.2xAl-B3-1:1:1 (SEQ ID NO:10), содержащий тандемные повторы конкретных областей энхансера, полученных из промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, функционально связанного 5'-концом с промотором, P-Os.Act1:67 (SEQ ID NO:11), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ta.Lhcb1:1 (SEQ ID NO:12), функционально связанного 5'-концом с интроном, I-Os.Act1-1:1:19 (SEQ ID NO:13), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью неомицинофосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:3 (SEQ ID NO:14), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Ta.Hsp17-1:1:1 (SEQ ID NO:15). Вторая трансгенная кассета экспрессии, клонированная в противоположном направлении по отношению к первой трансгенной

кассете экспрессии, содержала специфичный для семян промотор и представляла собой ту же трансгенную кассету экспрессии, что описана выше. Контрольный пакетный вектор с энхансером также содержал дополнительную трансгенную кассету экспрессии, которую использовали для отбора трансформированных клеток с использованием отбора с помощью глифосата.

[0101] Для анализа эффективности ISR в снижении взаимодействия между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии, ISR4_Stop (SEQ ID NO:1), ISR89 (SEQ ID NO:2), ISR97 (SEQ ID NO:5), ISR88 (SEQ ID NO:7) и ISR86 (SEQ ID NO:8) клонировали между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии контрольного пакетного вектора с энхансером, как показано на фиг. 1с. Клетки растения кукурузы сорта LH244 трансформировали с использованием способа трансформации, опосредованного *Agrobacterium*, подобного известным в данной области техники, с использованием двух контрольных пакетных векторов и пяти пакетных векторов, содержащих ISR. Трансформированные клетки растений индуцировали с образованием целых растений.

[0102] Качественный и количественный анализ GUS использовали для оценки активности элемента экспрессии в выбранных органах и тканях растения в трансформированных растениях. Для качественного анализа экспрессии GUS с помощью гистохимического окрашивания тотальные препараты или срезы тканей инкубировали с раствором для окрашивания GUS, содержащим 1 мг/мл X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуронид) в течение 5 ч. при 37°C и обесцвечивали 35% EtOH и 50% уксусной кислотой. Экспрессию GUS качественно определяли путем визуального осмотра отобранных органов или тканей растений на синюю окраску под стереомикроскопом или составным микроскопом. Для количественного анализа экспрессии GUS с помощью ферментативных анализов общий белок экстрагировали из выбранных тканей трансформированных растений кукурузы. От одного до двух микрограммов общего белка инкубировали с флуорогенным субстратом, 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкуронидом (MUG) в концентрации 1 мМ в общем реакционном объеме 50 микролитров. После 1 ч. инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 350 мкл 200 мМ раствора бикарбоната натрия. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцентный при высоких значениях pH, когда гидроксильная группа ионизирована. Добавление основного раствора карбоната натрия одновременно останавливает анализ и регулирует pH для количественного определения флуоресцентного продукта 4-MU. Количество

образовавшегося 4-MU оценивали путем измерения его флуоресценции с использованием устройства для считывания микропланшетов FLUOstar Omega (BMG LABTECH) (возбуждение при 355 нм, выпуск при 460 нм). Значения активности GUS представлены в нмолях 4- MU /час/мг общего белка.

- 5 [0103] Образцы следующих тканей брали для экспрессии GUS в поколении R₀: лист и корень стадии V3; лист и корень стадии V7; лист, корень, пыльник и кисть нитей рыльца стадии VT; и зародыш семени и эндосперм семени стадии R3 через 21 день после опыления (DAP). В таблице 2 показана средняя экспрессия GUS в вегетативной, репродуктивной и семенной тканях, где «bdl» указывает на то, что экспрессия GUS
- 10 была ниже уровней обнаружения. В таблице 3 показана средняя экспрессия GUS в вегетативной и репродуктивной тканях. Считается, что контроль с энхансером представляет собой полное взаимодействие энхансера первой трансгенной кассеты экспрессии со специфичным для семян промотором второй трансгенной кассеты экспрессии. Таким образом, средняя экспрессия в вегетативной и репродуктивной
- 15 ткани из кассеты GUS, которая управлялась специфичным для семян промотором P-Zm.39486-1:1:1, на который воздействовал сильный конститутивный энхансер первой трансгенной кассеты экспрессии, представляет собой утечку 100 процентов. Процент утечки пакетных векторов, содержащих ISR, определяли путем деления средней экспрессии GUS в вегетативных и репродуктивных тканях растений,
- 20 трансформированных конструкциями, содержащими ISR, на среднюю экспрессию GUS в вегетативных и репродуктивных тканях контроля с энхансером, и умножения результата на сто.

Таблица 2. Средняя экспрессия GUS в вегетативных, репродуктивных и семенных тканях стабильных трансформированных растений кукурузы LH244

Контроль/ ISR	SEQ ID NO:	V3- коре нь	V3- - ли ст	V7- коре нь	V7- - ли ст	VT- коре нь	VT- - ли ст	VT- пыль ник	VT- кис т ь ните й рыль ца	21- DA P- Em	21- DA P- En do
Контроль без энхансера		23	bdl	46	11	bdl	bdl	19	bdl	13	215
Контроль с энхансером		1469	13 10	1847	16 98	367	94 6	323	603	68	265 1
ISR4_Stop	1	409	71	255	84	169	60	296	31	197	116 9
ISR89	2	140	75	146	39	110	27	113	41	24	560
ISR97	5	35	39	22	78	38	41	146	41	27	269
ISR88	7	789	16 9	142	21 7	1671	45 6	1349	426	62	303 3
ISR86	8	370	35 5	144	90	712	38 0	628	85	40	164 5

5

Таблица 3. Средняя экспрессия GUS в вегетативных и репродуктивных тканях и средний процент утечки ISR по сравнению с контролями.

Контроль/ISR	SEQ ID NO:	Средняя экспрессия в вегетативных и репродуктивных	% утечки
--------------	------------------	---	-------------

		тканях	
Контроль энхансера	без	12	1%
Контроль энхансером	с	1070	100%
ISR4_Stop	1	172	16%
ISR89	2	87	8%
ISR97	5	55	6%
ISR88	7	652	61%
ISR86	8	346	32%

[0104] Как видно из таблицы 2, контроль с энхансером продемонстрировал высокую экспрессию GUS во всех тканях стабильно трансформированных растений кукурузы по сравнению с контролем без энхансера. Это демонстрирует, что сильный энхансер в первой трансгенной кассете экспрессии модифицировал специфичный для семян профиль экспрессии второй трансгенной кассеты экспрессии до более конститутивного профиля экспрессии.

[0105] Как показано в таблице 2, взаимодействие сильного энхансера в первой трансгенной кассете экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии было снижено, когда между кассетами были вставлены ISR ISR4_Stop, ISR89 и ISR97. Средняя экспрессия GUS вегетативной и репродуктивной тканей в пакетных векторах с ISR4_Stop, ISR89 и ISR97 была намного меньше, чем у контрольного вектора с энхансером. Процент утечки ISR4_Stop, ISR89 и ISR97 составлял 16%, 8% и 6% соответственно, что обеспечивало снижение взаимодействия между двумя трансгенными кассетами экспрессии на 84%, 92% и 94% соответственно. Для сравнения, ISR88 и ISR86 имели большую утечку (61% и 32% соответственно) и снижали взаимодействие между двумя трансгенными кассетами экспрессии только на 39% и 68% соответственно.

[0106] ISR4_Stop (SEQ ID NO:1), ISR89 (SEQ ID NO:2) и ISR97 (SEQ ID NO:5) продемонстрировали способность уменьшать взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии в пакетном векторе в стабильно трансформированных растениях кукурузы.

Пример 3

Снижение взаимодействия трансгенных кассет экспрессии с помощью ISR2 и ISR4 в стабильно трансформированных растениях сои

5

[0107] Этот пример демонстрирует способность элементов межгенной области последовательности, ISR2 и ISR4, снижать взаимодействие трансгенной кассеты экспрессии при вставке между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии пакетного вектора, используемого для стабильной трансформации растений сои.

10

[0108] Растения сои трансформировали бинарными пакетными векторами трансформации растений, содержащими две трансгенные кассеты экспрессии в противоположном направлении с ISR между двумя трансгенными кассетами экспрессии для оценки способности ISR уменьшать взаимодействие трансгенных кассет экспрессии. Два контрольных пакетных вектора также трансформировали в растения сои и тестировали.

15

[0109] Один контрольный пакетный вектор (фиг. 2а, контроль без энхансера) содержал одну трансгенную кассету экспрессии, состоящую из специфичного для семян промотора P-Gm.Sphas1:14 (SEQ ID NO:25), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Gm.Sphas1-1:1:1 (SEQ ID NO:26), функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью, кодирующей GUS-2, GOI-GUS:1:2 (SEQ ID NO:27), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Mt.AC145767v28:3 (SEQ ID NO:28). Контрольный пакетный вектор без энхансера также содержал дополнительную трансгенную кассету экспрессии, которую использовали для отбора трансформированных клеток с использованием отбора с помощью антибиотиков.

20

25

[0110] Другой контрольный пакетный вектор (фиг. 2b, контроль с энхансером) содержал две трансгенные кассеты экспрессии в противоположном направлении. Первая трансгенная кассета содержала сильный промотор, полученный из промотора 35S вируса мозаики норичника, с перегруппированным и дублированным энхансером, P-FMV.35S-enh-1:1:2 (SEQ ID NO:21), функционально связанного 5'-концом с лидерной последовательностью, L-Ph.DnaK-1:1:3 (SEQ ID NO:22),

30

функционально связанного 5'-концом с кодирующей последовательностью неоминифосфотрансферазы, CR-Ec.nptII-Tn5-1:1:2 (SEQ ID NO :23), функционально связанного 5'-концом с 3' UTR, T-Mt.AC139600v16:1 (SEQ ID NO:24). Вторая трансгенная кассета экспрессии была такой же, как трансгенная кассета экспрессии, специфичная для семян, описанная выше. Контрольный пакетный вектор с энхансером также содержал дополнительную трансгенную кассету экспрессии, которую использовали для отбора трансформированных клеток с использованием отбора с помощью антибиотиков.

[0111] Для анализа эффективности ISR в уменьшении взаимодействия между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии, ISR ISR2 (SEQ ID NO:3), ISR4 (SEQ ID NO:2), ISR69 (SEQ ID NO:6) и ISR_X (SEQ ID NO:8) клонировали между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии контрольного пакетного вектора с энхансером, как показано на фиг. 2с. Клетки растений сои сорта A3555 трансформировали с использованием способа трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, аналогичного известным в данной области техники, с использованием контроля без энхансера, контроля с энхансером и трех пакетных векторов, содержащих ISR. Трансформированные клетки растений индуцировали с образованием целых растений.

[0112] Качественный и количественный анализ GUS проводили, как описано выше в примере 2. Образцы следующих тканей брали для экспрессии GUS в поколении R₀: корень Vn5, лист-приемник Vn5, лист-источник Vn5, лист-источник R1, черешок R1, цветок R1, незрелое семя R3, стручок R3, семядоля R5, зародыш желтой фасоли (YP) и семядоля желтой фасоли (YP).

[0113] Считается, что контроль с энхансером представляет собой полное взаимодействие энхансера первой трансгенной кассеты экспрессии со специфичным для семян промотором второй трансгенной кассеты экспрессии. Таким образом, средняя экспрессия в вегетативной и репродуктивной ткани из кассеты GUS, которая управлялась специфичным для семян промотором P-Gm.Sphas1:14, на который воздействовал сильный конститутивный энхансер первой трансгенной кассеты экспрессии, представляет собой утечку 100 процентов. Процент утечки конструкций, содержащих ISR, определяли путем деления средней экспрессии GUS в тканях Vn5, R1 и R3 растений, трансформированных конструкциями, содержащими ISR, на среднюю

экспрессию GUS в тканях Vn5, R1 и R3 контроля с энхансером и умножения результата на сто.

[0114] Средняя экспрессия GUS в тканях Vn5, R1 и R3 представлена в таблице 4, где «nd» означает «не определено». Средняя экспрессия GUS в тканях R5 и желтой фасоли, средняя экспрессия в тканях Vn5, R1 и R3 и процент утечки представлены в таблице 5.

Таблица 4. Средняя экспрессия GUS тканей Vn5, R1 и R3 в стабильно трансформированных растениях сои A3555.

Контроль/ISR	SEQ ID NO:	Vn5 Коре нь	Vn5 лист-приемник	Vn5 лист-источник	R1 лист-источник	R1 черешок	R1 цветок	R3 незрелое семя	R3 початок
Контроль без энхансера		10	3	4	0	0	0	11	8
Контроль с энхансером		3072	2524	1939	2722	6369	2434	520	6236
ISR2	3	113	69	107	39	155	56	45	112
ISR4	4	207	33	86	28	349	84	31	97
ISR69	6	108	74	62	76	488	311	113	64
ISR_X	9	391	107	121	103	974	179	н/о	3654

10

Таблица 5. Средняя экспрессия GUS в тканях R5 и желтой фасоли, средняя экспрессия в тканях Vn5, R1 и R3 и процент утечки в стабильно трансформированных растениях сои A3555.

15

Контроль/ISR	SEQ ID NO:	R5 семядоля	Зародыш желтой фасоли	Семядоля желтой фасоли	Среднее Vn5, R1 и R3	% утечки
Контроль без энхансера		47	1445	4264	5	0%
Контроль с энхансером		2673	6746	6294	3227	100%
ISR2	3	3330	6308	6703	87	3%
ISR4	4	10066	3881	6267	114	4%
ISR69	6	3223	4114	5432	162	5%
ISR_X	9	5049	11495	11767	790	24%

[0115] Как видно из таблицы 4, очень низкая экспрессия GUS наблюдается в тканях Vn5, R1 и R3 у растений, трансформированных с помощью контроля без энхансера.

5 Растения, трансформированные контролем с энхансером, демонстрируют конститутивный профиль экспрессии, при этом высокая экспрессия GUS наблюдается в тканях Vn5, R1 и R3. Аналогичным образом, как видно в таблице 5, растения, трансформированные контролем без энхансера, демонстрируют только высокую экспрессию GUS в зародышах и семядолях желтой фасоли, что согласуется с

10 известным специфичным для семян профилем экспрессии P-Gm.Sphas1:14. Очень невысокая экспрессия наблюдается в семядолях R5, при этом экспрессия немного увеличивается по сравнению с незрелыми семенами R3. Растения, трансформированные контролем с энхансером, демонстрируют высокие уровни экспрессии в семядолях R5 и увеличение зародыша и семядолей желтой фасоли по

15 сравнению с растениями, трансформированными контролем без энхансера. Таким образом, сильный энхансер, содержащийся в промоторе P-FMV.35S-enh-1:1:2 первой трансгенной кассеты экспрессии контроля с энхансером, взаимодействовал со специфичной для семян экспрессией P-Gm.Sphas1:14 второй трансгенной кассеты экспрессии и изменял ее в конститутивный профиль экспрессии.

20 [0116] Как показано в таблице 5, области межгенной последовательности ISR2, ISR4 и ISR69 были способны снижать взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии конфигурации контроля с энхансером на

97%, 96% и 95% соответственно (утечки составляли только 3%, 4% и 5%). ISR_X была не столь эффективна в уменьшении взаимодействия первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии конфигурации контроля с энхансером и продемонстрировала утечку 24%. ISR_X уменьшила взаимодействие только на 76% по сравнению с 97%, 96%, 95% для ISR2, ISR4 и ISR69.

[0117] ISR2 (SEQ ID NO:3), ISR4 (SEQ ID NO:4) и ISR69 (SEQ ID NO:6) продемонстрировали способность уменьшать взаимодействие первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии в стабильно трансформированных растениях сои.

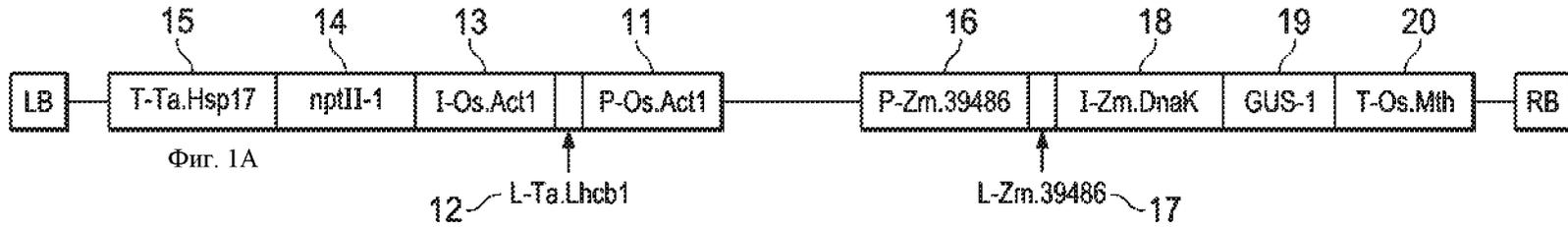
10 [0118] Проиллюстрировав и описав основные идеи настоящего изобретения, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что изобретение может быть изменено по схеме и деталям без отклонения от этих основных идей. Заявляются все модификации, которые находятся в рамках сущности и объема формулы изобретения. Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в
15 данном документе, настоящим включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения в качестве ссылки.

Формула изобретения

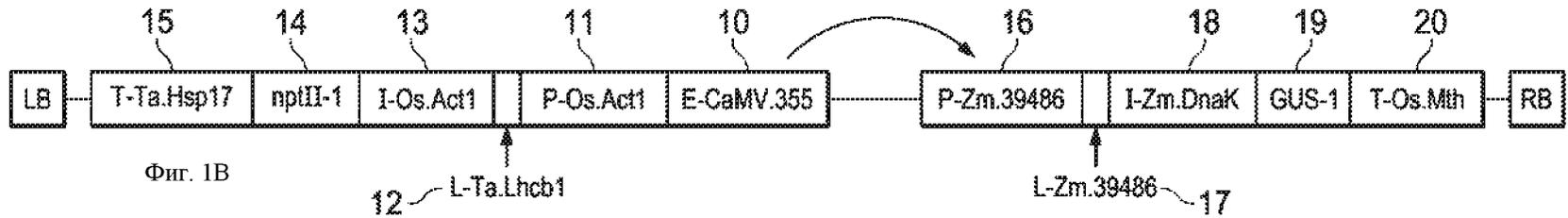
1. Рекомбинантная молекула ДНК, содержащая последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из:
 - а. последовательности с по меньшей мере 85-процентной идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO:1-6; и
 - б. последовательности, включающей любую из SEQ ID NO:1-6.
2. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, при этом последовательность ДНК вставлена между первой кассетой экспрессии и второй кассетой экспрессии в пакетном векторе.
3. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, при этом последовательность ДНК имеет по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательности ДНК любой из SEQ ID NO:1-6.
4. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, при этом последовательность ДНК имеет по меньшей мере 95-процентную идентичность последовательности ДНК любой из SEQ ID NO:1-6.
5. Рекомбинантная молекула ДНК по п. 1, при этом последовательность ДНК включает любую из SEQ ID NO:1-6.
6. Клетка трансгенного растения, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1.
7. Клетка трансгенного растения по п. 5, при этом указанная клетка трансгенного растения представляет собой клетку однодольного растения.
8. Клетка трансгенного растения по п. 5, при этом указанная клетка трансгенного растения представляет собой клетку двудольного растения.
9. Трансгенное растение или его часть, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1.
10. Растение-потомок трансгенного растения по п. 8 или его часть, при этом растение-потомок или его часть содержит молекулу рекомбинантной ДНК.
11. Трансгенное семя, при этом семя содержит рекомбинантную молекулу по п. 1.

12. Способ получения товарного продукта, включающий получение трансгенного растения или его части по п. 8 и получение из него товарного продукта.
13. Способ по п. 11, при этом товарный продукт представляет собой семена, обработанные семена, белковый концентрат, белковый изолят, крахмал, зерна, части растений, масло из семян, биомассу, муку мелкого помола и муку грубого помола.
14. Способ снижения взаимодействия первой трансгенной кассеты экспрессии со второй трансгенной кассетой экспрессии в трансгенном растении, трансформированном пакетным вектором, причем указанный способ включает трансформацию клетки растения пакетным вектором, содержащим гетерологичную транспортную ДНК (Т-ДНК), содержащую:
- a. первую трансгенную кассету экспрессии;
 - b. вторую трансгенную кассету;
 - c. рекомбинантную молекулу ДНК по п. 1, при этом молекула ДНК вставлена между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии; и
 - d. регенерацию трансгенного растения из трансформированной клетки растения.
15. Способ по п. 13, при этом молекула ДНК любой из SEQ ID NO:1-6 вставлена между первой трансгенной кассетой экспрессии и второй трансгенной кассетой экспрессии в пакетном векторе.

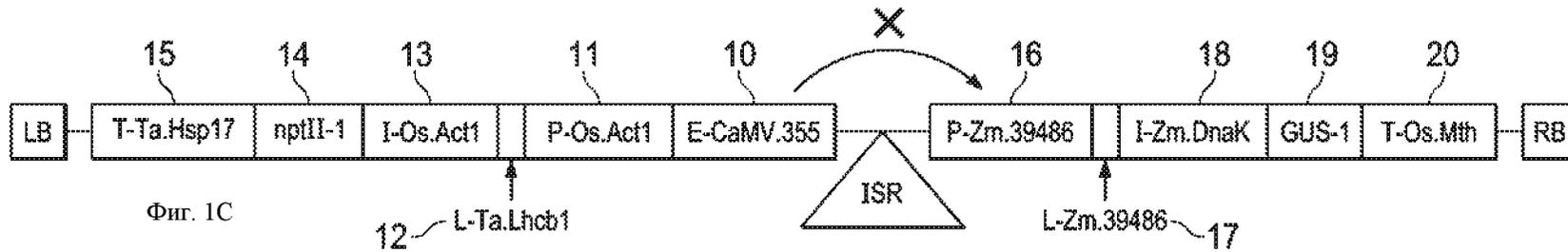
Контроль без энхансера



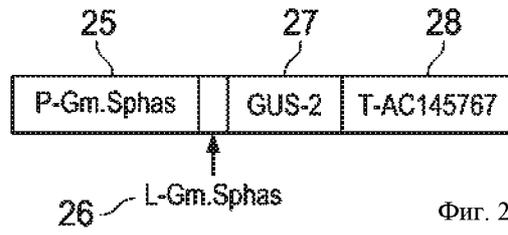
Контроль с энхансером



Вставка ISR между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии

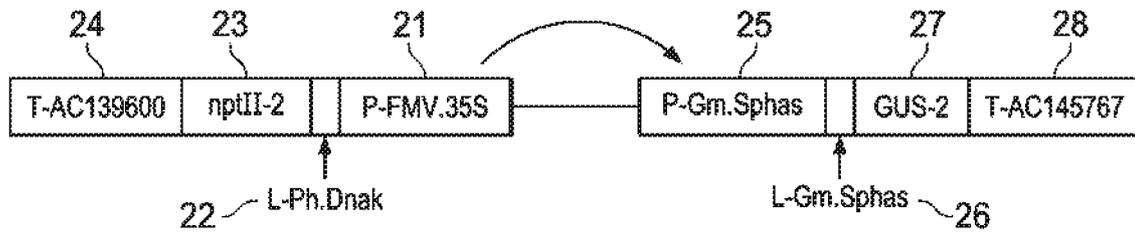


Контроль без энхансера



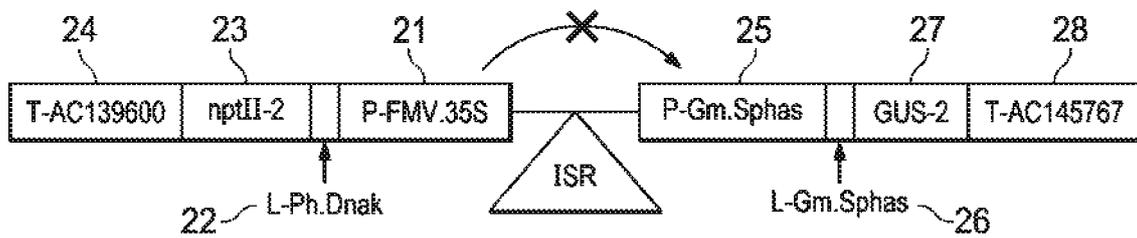
Фиг. 2А

Контроль с энхансером



Фиг. 2В

Вставка ISR между первой и второй трансгенными кассетами экспрессии



Фиг. 2С