

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290772 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.06

(22) Дата подачи заявки
2020.08.26

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2018.01)
C12N 15/32 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) ПРОМОТОРЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

(31) 62/896,735

(32) 2019.09.06

(33) US

(86) PCT/US2020/047899

(87) WO 2021/045942 2021.03.11

(71) Заявитель:
СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ
(CH)

(72) Изобретатель:

Азхаканадам Касималай, Чжоу
Айлин, Конвилл Джаред, Кларк V
Джозеф Даллас (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) Настоящее изобретение направлено на промоторы, которые характеризуются особой применимостью в управлении специфичной для корней экспрессией гетерологичных генов, которые придают данному трансгенному растению повышенные агрономические, садоводческие и/или пестицидные характеристики. Настоящее изобретение также относится к молекулам ДНК, содержащим промоторы по настоящему изобретению, и трансформированным тканям растений, содержащим молекулы ДНК, содержащие промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с гетерологичным геном или генами, а также их семенам.

A1

202290772

202290772

A1

ПРОМОТОРЫ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

5

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[001] Перечень последовательностей в текстовом формате ASCII, предоставленный в соответствии с 37 C.F.R. § 1.821, под названием “81937-REG-ORG-NAT-1_ST25.txt”, размером 239 килобайт, созданный 4 сентября 2019 г. и поданный с помощью EFS-Web, представлен вместо бумажной копии. Данный перечень последовательностей настоящим включен посредством ссылки в описание настоящего изобретения для его раскрытия.

10

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение в целом относится к области молекулярной биологии растений и регуляции экспрессии генов в растениях. Также раскрыты трансгенные эукариоты, в том числе трансгенные растительные клетки, растения и семена, чей геном включает молекулярные конструкции для контроля экспрессии гетерологичных генов.

15

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] Трансгенные сельскохозяйственные культуры состоят из все более сложных генетических модификаций, включая несколько трансгенов, которые придают различные признаки, также называемые «пакетами генов» или «пакетами признаков». Например, многие продукты из трансгенной кукурузы, представленные в настоящее время на рынке, содержат в одном и том же растении несколько генов, кодирующих инсектицидные белки для борьбы с широким спектром насекомых-вредителей, несколько генов, кодирующих белки, придающие растению выносливость к широкому спектру химических гербицидов, и несколько генов, кодирующих белки, которые используются в качестве селективируемых маркеров в процессе трансформации растений. Многие из трансгенных белков, используемых для контроля насекомых-вредителей, например кристаллические эндотоксины из *Bacillus thuringiensis* (называемые белками Cry), активны в отношении чешуекрылых или жесткокрылых насекомых-вредителей. Примеры белков Cry, активных в отношении чешуекрылых, включают Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F и Cry9. Примеры белков Cry, активных в отношении жесткокрылых, включают Cry3A, Cry3B, Cry3C, Cry8, бинарный Cry23-Cry37 и бинарный Cry34-

20

25

30

Сгу35. Большинство отдельных белков Сгу биологически активны в отношении узкого спектра видов насекомых в пределах данного отряда насекомых. Даже с таким узким спектром активности некоторые белки Сгу могут характеризоваться активностью от низкой до умеренной в отношении определенных видов, не являющихся вредителями, в том же порядке насекомых, что и целевые насекомые-вредители. Например, Hellmich et al. (2001) Proc. Natl. Aca. Sci. 98:11925-11930, обнаружили, что некоторые очищенные белки Сгу, активные в отношении чешуекрылых вредителей, например мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), также характеризуются некоторой активностью в отношении первых личиночных стадий чешуекрылого насекомого, не являющегося вредителем, данаиды-монарха (*Danaus plexippus*). Однако более поздние личиночные стадии *D. plexippus* были гораздо менее восприимчивы.

[004] В настоящее время экспрессия большинства трансгенов, кодирующих инсектицидные белки, в коммерческих трансгенных сельскохозяйственных культурах управляется конститутивными промоторами, т. е. промоторами, которые функционируют по всему растению во всех или большинстве типов тканей, включая ткань пыльца, на протяжении всего цикла роста растения. Поскольку пыльца растений может быть источником пищи для некоторых видов насекомых, не являющихся вредителями, или предполагается, что пыльца растений может переноситься ветром и оседать на растениях-хозяевах для насекомых, не являющихся вредителями, регулирующие органы, которые регулируют коммерциализацию трансгенных сельскохозяйственных культур, обеспокоены тем, что высокие уровни экспрессии некоторых инсектицидных белков, например некоторых белков Сгу, в пыльце могут оказывать неблагоприятное воздействие на локальные популяции насекомых, не являющихся вредителями. Кроме того, было замечено, что экспрессия определенных инсектицидных белков в пыльце оказывает неблагоприятное воздействие на мужскую фертильность трансгенного растения. Например, высокие уровни инсектицидного белка Vip3, экспрессированного в пыльце кукурузы, могут вызывать снижение мужской фертильности или полную стерильность у определенных инбредных генетических фонов (патент США № 10214784; включен в данный документ посредством ссылки). Следовательно, было бы полезно модулировать экспрессию инсектицидных белков в трансгенных растениях, к примеру, с целью обеспечить высокие уровни экспрессии в вегетативных тканях, например в ткани листа, где первоначально питается

большинство насекомых-вредителей, но при этом в пыльце, ткани растения, которой могут питаться некоторые насекомые, не являющиеся вредителями, обеспечить сниженные уровни экспрессии.

[005] Следовательно, необходимым является получение растений, в частности растений кукурузы, в которых экспрессия трансгена в тканях репродуктивных структур растения, таких как пыльца и/или метелка, исключена. Это может быть достигнуто в рамках настоящего изобретения путем обеспечения регуляторной нуклеотидной последовательности, по меньшей мере часть которой характеризуется функцией инициации транскрипции, управляющей экспрессией функционально связанного полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес белок, практически во всех тканях растения, при этом по сути исключая экспрессию в тканях мужских репродуктивных структур растения, в частности в тканях пыльцы и/или метелок, таким образом, что в этих тканях продукт экспрессии присутствует в малых количествах или отсутствует. Затем регуляторную нуклеотидную последовательность можно использовать для разработки систем экспрессии, которые обеспечивают эффективное накопление представляющего интерес белка, такого как, например, инсектицидный белок, в тканях, которыми обычно питаются целевые вредители, и исключение или уменьшение накопления инсектицидного белка в тканях или органах, не являющихся целевыми, и/или в тех тканях, которые могут быть подвержены воздействию белка, представляющего интерес.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[006] В настоящем изобретении представлены композиции и способы для избирательного управления экспрессией трансгена в тканях трансгенного растения. В частности, предложены новые промоторные полинуклеотиды, способные инициировать и/или модулировать транскрипцию полинуклеотида ДНК, с которым они функционально связаны. Промоторы по настоящему изобретению характеризуются своей способностью избирательно модулировать экспрессию любого функционально связанного полинуклеотида ДНК, такого как полинуклеотид, кодирующий инсектицидный белок, предпочтительно во многих тканях растений, таких как ткани листьев, стеблей, корней и т. п., за исключением мужских репродуктивных тканей, например ткани пыльцы.

[007] В некоторых аспектах промоторный полинуклеотид по настоящему изобретению содержит любую из SEQ ID NO:1-11 или комплементарные им последовательности, или фрагмент, участок, цис-элемент или полинуклеотиды,

относящиеся к любой из SEQ ID NO:1-11, которые функционируют как промоторы в растениях. Промоторы по настоящему изобретению управляют функциональной транскрипцией в любой растительной ткани, отличной от мужской репродуктивной ткани, т. е. ткани пыльцы, в которой транскрипция устранена или значительно снижена по сравнению с другими тканями растения, не относящимися к мужским репродуктивным.

[008] Настоящее изобретение дополнительно относится к химерным конструкциям, кассетам экспрессии и векторам, содержащим промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с полинуклеотидом гетерологичной ДНК, который кодирует белок, который необходимо экспрессировать в тканях растений, отличных от ткани пыльцы. Например, молекула рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению может содержать в направлении от 5' к 3' промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с последовательностью ДНК, которая кодирует инсектицидный белок, который активен в отношении насекомых-вредителей, питающихся тканями растений, и терминаторную последовательность, функционально связанную с 3'-концом гена, представляющего интерес. В некоторых аспектах терминаторная последовательность по настоящему изобретению содержит любую из SEQ ID NO:12-20 или комплементарных им последовательностей, или фрагмент, участок или нуклеотидные последовательности, относящиеся к любой из SEQ ID NO:12-20. В других аспектах вектор по настоящему изобретению представляет собой бинарный вектор, применимый для трансформации растений. В других аспектах бинарный вектор содержит любую из SEQ ID NO:21-28 или последовательности, относящиеся к любой из SEQ ID NO:21-28.

[009] В других аспектах регуляторные последовательности по настоящему изобретению функционально связаны с нуклеотидной последовательностью, кодирующей инсектицидный белок. Таким образом, при вставке кассеты экспрессии, содержащей промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с последовательностью, кодирующей инсектицидный белок, в геном растения, полученное в результате трансгенное растение будет защищено от нападения насекомых-вредителей, питающихся тканями, отличными от тканей пыльцы, такими как ткани листьев и стеблей, при этом полезные насекомые, питающиеся пыльцой, не подвергнутся воздействию.

[010] Настоящее изобретение также относится к трансгенным растениям, таким как трансгенные растения маиса, содержащим промотор, химерную конструкцию, кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению.

[011] Настоящее изобретение также относится к способам специфической экспрессии гетерологичной кодирующей последовательности в тканях трансгенных растений, за исключением некоторых мужских репродуктивных тканей, например ткани пыльцы, путем включения в геном растения молекулы рекомбинантной ДНК, содержащей промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с полинуклеотидом ДНК, который кодирует представляющий интерес белок, такой как инсектицидный белок.

[012] В настоящем изобретении дополнительно предусматривают способ ограничения мужской стерильности в трансгенном растении, например инбредном растении кукурузы, путем включения в геном растения молекулы рекомбинантной ДНК, содержащей промотор по настоящему изобретению, функционально связанный с полинуклеотидом ДНК, который кодирует белок, вызывающий мужскую стерильность при экспрессии в мужской репродуктивной ткани, такой как ткань пыльцы. В некоторых аспектах белок представляет собой инсектицидный белок Vtp3, а трансгенное растение представляет собой инбредное растение кукурузы.

[013] Вышеупомянутые и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания, сопровождающих графических материалов и перечней последовательностей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP370-3.

SEQ ID NO:2 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP393-1.

SEQ ID NO:3 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP393-2.

SEQ ID NO:4 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP393-3.

SEQ ID NO:5 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP393-4.

SEQ ID NO:6 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP855-1.

SEQ ID NO:7 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP747-1.

5 SEQ ID NO:8 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP004-1.

SEQ ID NO:9 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP335-1.

10 SEQ ID NO:10 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP722-1.

SEQ ID NO:11 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора PMP948-2.

SEQ ID NO:12 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t370-2.

15 SEQ ID NO:13 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t393-1.

SEQ ID NO:14 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t393-2.

20 SEQ ID NO:15 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t855-1.

SEQ ID NO:16 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t747-1.

SEQ ID NO:17 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t004-1.

25 SEQ ID NO:18 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t335-1.

SEQ ID NO:19 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t722-1.

30 SEQ ID NO:20 представляет собой нуклеотидную последовательность терминатора t948-2.

SEQ ID NO:21 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18499.

SEQ ID NO:22 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18500.

SEQ ID NO:23 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18501.

SEQ ID NO:24 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18498.

5 SEQ ID NO:25 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18617.

SEQ ID NO:26 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18618.

10 SEQ ID NO:27 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18619.

SEQ ID NO:28 представляет собой нуклеотидную последовательность бинарного вектора pSYN18705.

SEQ ID NO:29 представляет собой нуклеотидную последовательность кассеты экспрессии PMP393-4:Cry1Ai.

15 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[014] Не подразумевается, что данное описание является подробным перечнем всех различных способов, посредством которых может быть реализовано настоящее изобретение, или всех признаков, которые можно добавить к настоящему изобретению. Например, признаки, проиллюстрированные в отношении одного

20 варианта осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, а признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть удалены из данного варианта осуществления. Таким образом, в настоящем изобретении предполагается, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно исключить или опустить любой

25 признак или комбинацию признаков, изложенных в данном документе. Кроме того, многочисленные вариации и дополнения к различным вариантам осуществления, предлагаемым в данном документе, будут очевидны для специалистов в данной области в свете настоящего раскрытия, которое не отступает от сути настоящего изобретения. Следовательно, следующие описания предназначены для иллюстрации

30 некоторых конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, а не исчерпывающего определения всех их преобразований, комбинаций и вариаций.

[015] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области, к которой относится настоящее изобретение.

Терминология, используемая в данном документе в описании настоящего изобретения, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предполагает ограничение настоящего изобретения.

Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, *Genes V*, опубликованной Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, опубликованная Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликовано VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[016] Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, цитируемые в данном документе, включены с помощью ссылки во всей своей полноте для объяснения идей, относящихся к предложению и/или абзацу, в котором приведена данная ссылка.

[017] Нуклеотидные последовательности, предусмотренные в данном документе, представлены в направлении от 5' - к 3'-концу слева направо и представлены с применением стандартного кода для представления нуклеиновых оснований, как изложено в разделе 37 CFR, §§1.821-1.825 и в стандарте ST.25 Всемирной организации интеллектуальной собственности (WIPO), например аденин (A), цитозин (C), тимин (T) и гуанин (G).

[018] Аналогичным образом, аминокислоты обозначены с применением стандарта ST.25 WIPO, например: аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), цистеин (Cys; C), глутамин (Gln; Q), глутаминовая кислота (Glu; E), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

[019] Если контекст не указывает на иное, то, в частности, предполагается, что различные признаки настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно применять в любой комбинации. Более того, в настоящем изобретении также предполагается, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения любой признак или комбинацию признаков, изложенных в данном документе, можно исключить или опустить. С целью иллюстрации, если в данном описании утверждается, что композиция содержит компоненты А, В и С, то это, в частности, предполагает, что любое из А, В или С или их комбинацию можно опустить и отклонить по отдельности или в любой комбинации.

[020] Для ясности определенные термины, используемые в данном описании, определены и представлены как указано далее.

[021] Форма единственного числа, используемая в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "растение" является ссылкой на одно или несколько растений и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т. д.

[022] Используемое в данном документе выражение "и/или" означает и охватывает любые возможные комбинации одного или нескольких из ассоциированных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в качестве альтернативы «или».

[023] Термин "приблизительно", используемый в данном документе, означает примерно, ориентировано, около или в районе. Если термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы в большую и меньшую стороны от указанных числовых значений. В целом термин "приблизительно", используемый в данном документе, модифицирует числовое значение в большую и меньшую стороны от указанного значения путем отклонения на 20 процентов, предпочтительно на 10 процентов вверх или вниз (больше или меньше). Что касается температуры, термин "приблизительно" означает $\pm 1^{\circ}\text{C}$, предпочтительно $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Если термин "приблизительно" применяется в контексте настоящего изобретения (например, в комбинациях с температурой или значениями молекулярной массы), предпочтительным является точное значение (то есть, без "приблизительно").

[024] Термин "амплифицированный", используемый в данном документе, означает конструирование нескольких копий молекулы нуклеиновой кислоты или нескольких копий, комплементарных молекуле нуклеиновой кислоты, с использованием по меньшей мере одной из молекул нуклеиновых кислот в качестве матрицы. Системы амплификации включают систему на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), систему на основе лигазной цепной реакции (LCR), систему амплификации, основанной на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA, Cangene, Миссиссога, штат Онтарио, США), систему на основе Q-бета-репликазы, систему амплификации, основанной на транскрипции (TAS), и амплификацию с замещением нитей (SDA). См., например, Diagnostic Molecular Microbiology:

Principles and Applications, PERSING et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Продукт амплификации называется "ампликоном".

[025] "Активность" инсектицидного белка означает, что инсектицидный белок функционирует как активное при пероральном поглощении средство для контроля насекомых, характеризуется токсическим эффектом и/или способно нарушать или сдерживать поедание насекомыми, что может вызывать или не вызывать смерть насекомого. В случае если инсектицидный белок доставляется в организм насекомого, то результатом обычно является гибель насекомого или же насекомое не поедает источник, который делает инсектицидный белок доступным для насекомого. "Пестицидной" называется токсическая биологическая активность, способная осуществлять контроль вредителя, такого как насекомое, нематода, гриб, бактерии или вирус, предпочтительно путем их уничтожения или разрушения. "Инсектицидной" называется токсическая биологическая активность, способная осуществлять контроль насекомых, предпочтительно путем их уничтожения. "Пестицидное средство" представляет собой средство, которое характеризуется пестицидной активностью. "Инсектицидное средство" представляет собой средство, которое характеризуется инсектицидной активностью.

[026] В контексте настоящего документа выражения "возвратное скрещивание" и "проведение возвратного скрещивания" относятся к способу, при помощи которого растение-потомок возвратно скрещивают с одним из его родителей в течение одного или нескольких поколений (например, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более или 7 или более раз и т. д.). В схеме возвратного скрещивания "донорный родитель" относится к родительскому растению с требуемым геном, или конструкцией ДНК, или локусом, подлежащим интрогрессии. "Реципиентный" родитель (используемый один или несколько раз) или "рекуррентный" родитель (используемый два или более раз) относится к родительскому растению, в которое интрогрессируется ген, или конструкция ДНК, или локус. Например, см. Ragot et al. Marker-assisted Backcrossing: A Practical Example в TECHNIQUES ET UTILISATIONS DES MARQUEURS MOLECULAIRES LES COLLOQUES, Vol. 72, pp. 45-56 (1995) и Openshaw et al., Marker-assisted Selection in Backcross Breeding, in PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM "ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA," pp. 41-43 (1994). Первое скрещивание дает начало поколению F1. Термин "BC1" относится ко второму применению рекуррентного родителя, "BC2" относится к третьему применению

рекуррентного родителя и так далее. В вариантах осуществления по меньшей мере одно или несколько поколений потомства выявляют и/или отбирают по наличию требуемого гена или локуса (например, в образце нуклеиновой кислоты от растения-потомка или части растения-потомка). В вариантах осуществления два
 5 или более поколений (или даже все поколения) потомства выявляют и/или отбирают по наличию требуемого гена, или конструкции ДНК, или локуса.

[027] Термин “химерная конструкция”, или “химерный ген”, или “химерный полинуклеотид”, или “химерная нуклеиновая кислота”, или “химерный белок” (или аналогичные термины), используемый в настоящем документе, относится к
 10 конструкции, или молекуле нуклеиновой кислоты, или белку, содержащим два или более полинуклеотидов, или аминокислотные мотивы или домены, соответственно, различного происхождения, собранные в одну молекулу нуклеиновой кислоты или белок. Термины “химерная конструкция”, “химерный ген”, “химерный полинуклеотид” или “химерная нуклеиновая кислота” относятся к любой
 15 конструкции или молекуле, которые содержат без ограничения (1) полинуклеотиды (например, ДНК), в том числе регуляторные и кодирующие полинуклеотиды, которые вместе не встречаются в природе (т. е. по меньшей мере один из полинуклеотидов в конструкции является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее других полинуклеотидов), или (2) полинуклеотиды,
 20 кодирующие части белков, не связанные в природе, или (3) части промоторов, которые не связаны в природе. Кроме того, химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из различных источников, или могут содержать регуляторные полинуклеотиды и
 25 кодирующие полинуклеотиды, полученные из одного и того же источника, но расположенные иным образом, нежели как они встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота содержат кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид по настоящему
 30 изобретению под контролем регуляторных полинуклеотидов, в частности, под контролем регуляторных полинуклеотидов, функционирующих в растениях или бактериях.

[028] “Кодирующая последовательность” представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется в РНК, такую как mRNA, rRNA,

tRNA, snRNA, смысловая РНК или антисмысловая РНК. В некоторых аспектах РНК затем транслируется в организме, таком как растение кукурузы, с получением белка, например инсектицидного белка по настоящему изобретению. В других аспектах РНК не транслируется с получением белка, а функционирует как молекула РНК для модуляции экспрессии рекомбинантного инсектицидного белка по настоящему изобретению.

[029] Термин “кодон-оптимизированная” последовательность, используемый в данном документе, означает нуклеотидную последовательность, в которой кодоны выбраны так, чтобы отображать склонность к определенным кодонам, которая может наблюдаться в клетке- или организме-хозяине. Обычно это осуществляется таким образом, чтобы сохранить аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая подлежит оптимизации. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК конструкции рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению включает кодоны, оптимизированные для клетки (например, клетки животного, растения или гриба), в которой должна экспрессироваться конструкция. Например, в конструкции, которая будет экспрессироваться в растительной клетке, могут быть кодон-оптимизированы вся последовательность или ее части (например, первый элемент для супрессии гена или элемент для экспрессии гена) для экспрессии в растении. См., например, патент США № 6121014, включенный в данный документ посредством ссылки.

[030] Термины “содержит” или “содержащий”, при применении в настоящем описании, указывают на присутствие определенных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов или компонентов, но не исключают присутствие или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов или их групп.

[031] Используемая в данном документе переходная фраза “по сути состоящий из” (и ее грамматические варианты) означает, что объем пункта формулы изобретения следует интерпретировать как охватывающий указанные материалы или этапы, перечисленные в пункте формулы изобретения, и таковые, которые существенно не изменяют основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения. Таким образом, предусмотрено, что термин “состоящий по сути из”, когда он применяется в пункте формулы настоящего изобретения, не интерпретируется как эквивалентный термину “содержащий”.

[032] "Контроль" насекомых означает подавление посредством токсического воздействия способности насекомых-вредителей к выживанию, росту, питанию или размножению, или ограничение повреждения или потери сельскохозяйственных культур, вызванных насекомыми, или защиту максимального потенциального урожая сельскохозяйственной культуры при выращивании в присутствии насекомых-вредителей. "Контроль" насекомых может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя предпочтительно означает уничтожение насекомых.

[033] Используемый в данном документе термин "кукуруза" является синонимом термина "маис" или "*Zea mays*".

[034] Используемые в данном документе термины "скрещивание" или "скрещиваемый" относятся к слиянию гамет в результате опыления с получением потомка (например, клеток, семян или растений). Данный термин охватывает как половое скрещивание (опыление одного растения другим), так и самоопыление (гомеклиное опыление, например, если пыльца и семязачаток происходят от одного и того же растения). Термин "скрещивание" относится к акту слияния гамет в результате опыления с получением потомка.

[035] Термин "экзон" относится к части ДНК, которая несет последовательность, кодирующую белок или его часть. Экзоны отделены друг от друга вставочными некодирующими последовательностями (интронами). Для целей настоящего изобретения определение термина "экзон" включает модификации нуклеотидной последовательности экзона, полученного из целевого гена, при условии, что модифицированный экзон не снижает значительно активность связанной с ним 5'-регуляторной последовательности.

[036] "Кассета экспрессии", используемая в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующую клетку-хозяина, содержащую промотор, функционально связанный с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью, которая функционально связана с сигналами терминации. Она также обычно содержит последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. По меньшей мере один из компонентов кассеты экспрессии, содержащей представляющую интерес нуклеотидную последовательность, может быть гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из других ее компонентов. Кассета экспрессии также

может представлять собой последовательность, которая встречается в природе, но была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Такое использование кассеты экспрессии обеспечивает то, что она является не встречающейся в природе в клетке, в которую была введена. Однако, как правило, кассета экспрессии является гетерологичной по отношению к хозяину, т. е. конкретная последовательность нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии не встречается в клетке-хозяине в природе, и ее необходимо было ввести в клетку-хозяина или предка клетки-хозяина с помощью процесса трансформации.

Экспрессия нуклеотидной последовательности в кассете экспрессии может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцируемого промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда клетка-хозяин подвергается воздействию некоторого определенного внешнего стимула. В случае многоклеточного организма, такого как растение, промотор также может быть специфичным по отношению к конкретной ткани, или органу, или стадии развития.

[037] Кассета экспрессии также необязательно может содержать участок терминирования транскрипции и/или трансляции (т. е. участок терминирования), функционирующий в растениях. Разнообразные терминаторы транскрипции доступны для применения в кассетах экспрессии, и они отвечают за терминирование транскрипции за пределами представляющей интерес гетерологичной нуклеотидной последовательности и правильное полиаденилирование mRNA. Участок терминирования может быть нативным по отношению к участку инициации транскрипции, может быть нативным по отношению к функционально связанной представляющей интерес нуклеотидной последовательности, может быть нативным по отношению к растению-хозяину или может быть получен из другого источника (т. е. быть чужеродным или гетерологичным по отношению к промотору, представляющей интерес нуклеотидной последовательности, растению-хозяину или любой их комбинации). Надлежащие терминаторы транскрипции включают без ограничения терминатор гена 35S CAMV, терминатор гена tml, терминатор гена нопалинсинтазы и/или терминатор гена gbcS-E9 гороха. Они могут применяться как у однодольных, так и у двудольных растений. В дополнение, может применяться нативный терминатор транскрипции кодирующей последовательности. В контексте настоящего изобретения может применяться любой доступный терминатор, о котором известно, что он функционирует в растениях.

[038] Термин "экспрессия" при использовании в отношении полинуклеотида, такого как ген, открытая рамка считывания (ORF) или ее части, или трансгена в растениях относится к процессу преобразования генетической информации, закодированной в гене, в РНК (например, mRNA, rRNA, tRNA или snRNA) посредством "транскрипции" гена (т. е. благодаря ферментативному действию РНК-полимеразы) и в белок в соответствующих случаях (например, если ген кодирует белок) посредством "трансляции" mRNA. Экспрессия гена может регулироваться на многих стадиях в ходе этого процесса. Например, в случае антисмысловых конструкций или конструкций представляющих собой dsRNA, соответственно экспрессия может относиться к транскрипции только антисмысловой РНК или только dsRNA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "экспрессия" относится к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (mRNA) или функциональной РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "экспрессия" относится к продукции белка.

[039] Используемый в данном термин "функционально транскрибируемый" означает, что экспрессия регуляторного полинуклеотида по настоящему изобретению обеспечивает получение представляющего интерес белка, в количестве, которое придает ткани, в которой вырабатывается белок, фенотип, отвечающий его назначению. Например, без ограничения, полинуклеотид, кодирующий инсектицидный белок, который "функционально транскрибируется" в ткани листа трансгенного растения, например трансгенного растения маиса, обеспечивает получение инсектицидного белка в количестве, токсичном для насекомого-вредителя, питающегося на ткани листа, в которых вырабатывается инсектицидный белок. Альтернативно, термин "функционально транскрибируемый" означает, что количество белка, вырабатываемого в любой ткани трансгенного растения, составляет по меньшей мере 50 нг/мг общего растворимого белка (TSP), или по меньшей мере 100 нг/мг TSP, или по меньшей мере 500 нг/мг (TSP), или по меньшей мере 800 нг/мг TSP, или по меньшей мере 1000 нг/мг TSP, или по меньшей мере 2000 нг/мг TSP, или по меньшей мере 3000 нг/мг TSP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полинуклеотид, функционально связанный с промотором по настоящему изобретению, может "функционально транскрибироваться" в тканях, отличных от тканей пыльцы, и транскрибироваться на очень низких уровнях в ткани пыльцы трансгенного растения и, следовательно, обеспечивать получение очень небольшого количества белка в ткани пыльцы. Такое

очень низкое количество белка может варьироваться от приблизительно 1 нг/мг TSP до приблизительно 15 нг/мг TSP. Такие низкие уровни экспрессии не означают, что полинуклеотид “функционально транскрибируется” в пыльце, в частности, по сравнению с другими тканями, отличными от тканей пыльцы, того же трансгенного растения. В других вариантах осуществления уровень белка, вырабатываемого в ткани, отличной от ткани пыльцы, трансгенного растения, например трансгенного растения маиса, в по меньшей мере 100 раз выше, чем в ткани пыльцы того же трансгенного растения, или в по меньшей мере 200 раз выше, или в по меньшей мере 300 раз выше, или в по меньшей мере 400 раз выше, или в по меньшей мере 500 раз выше, или в по меньшей мере 600 раз выше, или в по меньшей мере 700 раз выше, или в по меньшей мере 800 раз выше, или в по меньшей мере 900 раз выше, или в по меньшей мере 1000 раз выше, чем в ткани пыльцы того же трансгенного растения.

[040] "Ген" представляет собой определенный участок, который расположен внутри генома и содержит кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты и, как правило, также содержит другие, преимущественно регуляторные нуклеиновые кислоты, ответственные за контроль экспрессии, иными словами транскрипции и трансляции кодирующей части. Ген может также содержать другие 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности и последовательности терминации.

Дополнительными элементами, которые могут присутствовать, являются, например, интроны. Регуляторная последовательность нуклеиновой кислоты гена в норме может не быть функционально связанной с ассоциированной последовательностью нуклеиновой кислоты, как это встречается в природе, и в таком случае ген будет химерным геном.

[041] "Представляющий интерес ген" относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которая, в случае переноса в растение, придает растению требуемый признак, такой как устойчивость к антибиотикам, устойчивость к вирусам, устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям или устойчивость к другим вредителям, переносимость гербицидов, переносимость абиотического стресса, мужская стерильность, модифицированный метаболизм жирных кислот, модифицированный метаболизм углеводов, улучшенная пищевая ценность, улучшенные характеристики при промышленном способе или измененная репродуктивная способность. "Представляющий интерес ген" также может являться

таким, который переносят в растения для получения коммерчески ценных ферментов или метаболитов в растении.

[042] "Гетерологичная" последовательность нуклеиновой кислоты или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты или молекулу нуклеиновой кислоты, которая в природе не ассоциирована с клеткой-хозяином, в которую ее вводят, в том числе не встречающиеся в природе множественные копии встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты или молекула нуклеиновой кислоты может содержать химерную последовательность, такую как химерная кассета экспрессии, где промотор и кодирующий участок получены из нескольких исходных организмов. Последовательность промотора может представлять собой последовательность конститутивного промотора, последовательность тканеспецифичного промотора, последовательность химически индуцируемого промотора, последовательность индуцируемого повреждением промотора, последовательность индуцируемого стрессом промотора или последовательность специфичного для стадии развития промотора.

[043] "Гомологичная" последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, в природных условиях связанную с клеткой-хозяином, в которую ее вводят.

[044] Термины "идентичность", или "идентичный", или "по сути идентичный" в контексте двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые характеризуются по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью нуклеотидных или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что определено с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуальной проверки. Предпочтительно значительная степень идентичности имеет место в пределах участка последовательностей, который состоит из по меньшей мере приблизительно 50 остатков или оснований в длину, более предпочтительно в пределах участка, состоящего из по меньшей мере приблизительно 100 остатков или оснований, и наиболее предпочтительно последовательности в значительной степени идентичны в пределах по меньшей мере приблизительно 150 остатков или

оснований. В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательности являются по сути идентичными по всей длине кодирующих участков. Кроме того, по сути идентичные последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности выполняют фактически

5 одинаковую функцию.

[045] При сравнении последовательностей одна последовательность обычно выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в

10 компьютер, при необходимости задают координаты подпоследовательности и задают программные параметры алгоритма сравнения последовательностей. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей на основе заданных программных параметров вычисляют процентную идентичность последовательностей для тестируемой(-ых) последовательности(-ей) относительно

15 эталонной последовательности.

[046] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии согласно Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания согласно Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443

20 (1970), с помощью способа поиска сходства согласно Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), с помощью реализации этих алгоритмов в компьютерных программах (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, штат Висконсин, США) или с помощью визуальной проверки

25 (см. в целом Ausubel с соавт., ниже).

[047] Одним примером алгоритма, который подходит для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является

30 общедоступным в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Бетесда, Мэриленд 20894, США). Данный алгоритм предусматривает вначале идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) путем идентификации коротких "слов" длиной W в запрашиваемой

последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со "словом" такой же длины в последовательности из базы данных. T называется предельным показателем соседнего "слова" (Altschul с соавт., 1990). Эти исходные совпадения соседних "слов" служат как затравка для запуска поисков с целью выявления более длинных HSP, которые их содержат. Совпадения "слов" затем продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться совокупный показатель выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей совокупные показатели рассчитывают с использованием параметров M (балл вознаграждения, который начисляется за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл, который начисляется за несовпадающие остатки; всегда < 0). В случае аминокислотных последовательностей для расчета совокупного показателя применяют матрицу замен. Продление совпадений "слов" в каждом направлении прекращается, когда совокупный показатель выравнивания снижается на величину X от своего максимального достигнутого значения, при этом совокупный показатель падает до нуля или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными показателями или при достижении конца одной из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию использует длину "слова" (W), составляющую 11, ожидаемое значение (E), составляющее 10, пороговое значение, составляющее 100, $M = 5$, $N = -4$, а также сравнение обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину "слова" (W), составляющую 3, ожидаемое значение (E), составляющее 10, а также матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc Natl Acad. Sci USA 89: 10915 (1989)).

[048] В дополнение к расчету процентной идентичности последовательностей

алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Одной мерой сходства, предоставленной алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая является показателем вероятности, что совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будут наблюдаться случайным образом. Например, тестируемая последовательность нуклеиновой кислоты считается сходной с

эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой последовательности нуклеиновой кислоты с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты составляет менее чем приблизительно 0,1, более предпочтительно менее чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 0,001.

[049] Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты по сути идентичны, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях. Фраза "гибридизируется специфически с" относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы только с определенной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях, в случае если такая последовательность присутствует в сложной смеси (например, общих клеточных) ДНК или РНК. "Связываются(-ется) в значительной степени" относится к комплементарной гибридизации между нуклеиновой кислотой-зондом и нуклеиновой кислотой-мишенью и охватывает незначительные несовпадения, которые могут быть исправлены путем снижения жесткости среды для гибридизации, чтобы достичь требуемого выявления целевой последовательности нуклеиновой кислоты.

[050] "Жесткие условия гибридизации" и "жесткие условия отмывки при гибридизации" в отношении экспериментов по гибридизации нуклеиновых кислот, таких как Саузерн- и Нозерн-гибридизации, зависят от последовательности и отличаются при различных параметрах окружающей среды. Более длинные последовательности специфично гибридизируются при более высоких температурах. Обширное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, part I, chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York. Обычно условия гибридизации и отмывки высокой жесткости выбирают так, чтобы температура была приблизительно на 5°C ниже точки плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH. Обычно в "жестких условиях" зонд будет гибридизоваться со своей целевой подпоследовательностью, а не с другими последовательностями.

[051] Значение T_m представляет собой температуру (при определенных значениях ионной силы и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизируется с точно подобранным зондом. Для очень жестких условий выбирают температуру,

равную T_m для конкретного зонда. Примером жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые содержат больше 100 комплементарных остатков на фильтре при Саузерн- или Нозерн-блоттинге, является 50% формамида с 1 мг гепарина при 42°C, при этом гибридизацию осуществляют в течение ночи. Примером условий отмывки высокой жесткости является 0,15 M NaCl при 72°C в течение приблизительно 15 минут. Примером жестких условий отмывки является отмывка с помощью $0,2 \times SSC$ при 65°C в течение 15 минут (описание буфера SSC см. в Sambrook, ниже). Часто с целью удаления фонового сигнала зонда отмывке в условиях высокой жесткости предшествует отмывка в условиях низкой жесткости. Примером отмывки средней жесткости для дуплекса, который содержит, например, более чем 100 нуклеотидов, является $1 \times SSC$ при 45°C в течение 15 минут. Примером условий отмывки низкой жесткости для дуплекса, который содержит, например, больше чем 100 нуклеотидов, является $4-6 \times SSC$ при 40°C в течение 15 минут. Для коротких зондов (например, длиной от приблизительно 10 до 50 нуклеотидов) жесткие условия обычно предусматривают концентрации солей, составляющие менее чем приблизительно 1,0 M ионов Na, как правило, концентрацию, составляющую от приблизительно 0,01 до 1,0 M ионов Na (или других солей) при pH 7,0-8,3, а также температуру, как правило, составляющую по меньшей мере приблизительно 30°C. Жестких условий также можно достичь путем добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. В целом соотношение сигнал-шум, в $2 \times$ раза (или больше) превышающее наблюдаемое для неродственного зонда в конкретном гибридизационном анализе, указывает на выявление специфической гибридизации. Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизируются друг с другом в жестких условиях, по-прежнему являются по сути идентичными, если белки, которые они кодируют, являются по сути идентичными. Например, это происходит в том случае, когда копию нуклеиновой кислоты создают с применением максимальной вырожденности кодонов, допускаемой генетическим кодом.

[052] Примеры комплексов условий гибридизации/отмывки, которые можно

применять для клонирования гомологичных нуклеотидных последовательностей, по сути идентичных эталонным нуклеотидным последовательностям по настоящему изобретению, являются следующими: эталонная нуклеотидная последовательность предпочтительно гибридизируется с эталонной нуклеотидной последовательностью в 7% додецилсульфате натрия (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA при 50°C с

отмывкой в $2\times$ SSC, 0,1% SDS при 50°C, более желательно в 7% додецилсульфате натрия (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмывкой в $1\times$ SSC, 0,1% SDS при 50°C, более желательно в 7% додецилсульфате натрия (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмывкой в $0,5\times$ SSC, 0,1% SDS при 50°C, предпочтительно в 7% додецилсульфате натрия (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмывкой в $0,1\times$ SSC, 0,1% SDS при 50°C, более предпочтительно в 7% додецилсульфате натрия (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA при 50°C с отмывкой в $0,1\times$ SSC, 0,1% SDS при 65°C.

[053] Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновых кислот или белки по сути идентичны, является то, что белок, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, характеризуется иммунологической перекрестной реактивностью с белком, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, или специфически связывается с ним. Таким образом, белок обычно является по сути идентичным второму белку, например, если два белка отличаются только консервативными заменами.

[054] Термин "интрон" относится к промежуточному фрагменту ДНК, который встречается практически исключительно в эукариотическом гене, но не транслируется в аминокислотные последовательности в продукте гена. Интроны удаляются из незрелой пре-mRNA посредством процесса, называемого сплайсингом, который не затрагивает экзоны, с формированием mRNA. Для целей настоящего изобретения определение термина "интрон" включает модификации нуклеотидной последовательности интрона, полученного из целевого гена, при условии, что модифицированный интрон не снижает значительно активность связанной с ним 5'-регуляторной последовательности.

[055] Термин "выделенные" молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотид или белок означает молекулу нуклеиновой кислоты, полинуклеотид или белок, которые больше не находятся в своей естественной среде. Выделенные молекула нуклеиновой кислоты, полинуклеотид или белок по настоящему изобретению могут находиться в очищенной форме или могут находиться в рекомбинантном хозяине, таком как трансгенная бактерия или трансгенное растение. Итак, в случае использования термина "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты в пунктах формулы изобретения, перечисленных в данном документе, этот термин охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, если таковая содержится в пределах генома трансгенного растения.

[056] "Молекула нуклеиновой кислоты" или "последовательность нуклеиновой кислоты" представляет собой сегмент одно- или двухнитевой ДНК или РНК, который может быть выделен из любого источника. В контексте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты обычно представляет собой сегмент ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляют собой выделенные молекулы нуклеиновой кислоты.

[057] "Функционально связанный" относится к ассоциации полинуклеотидов на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, вследствие чего функция одного влияет на функцию другого. Например, промотор функционально связан с кодирующим полинуклеотидом или функциональной РНК, в случае если он может влиять на экспрессию такого кодирующего полинуклеотида или функциональной РНК (т. е. такие кодирующий полинуклеотид или функциональная РНК находятся под контролем промотора на уровне транскрипции). Кодирующие полинуклеотиды в смысловой или антисмысловой ориентации могут быть функционально связаны с регуляторными полинуклеотидами.

[058] Термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются в данном документе взаимозаменяемо.

[059] "Растение" представляет собой любое растение на любой стадии развития, в частности семенное растение.

[060] "Растительная клетка" представляет собой структурную и физиологическую единицу растения, содержащую протопласт и клеточную стенку. Растительная клетка может находиться в форме выделенной отдельной клетки, или культивированной клетки, или в виде части более высокоорганизованной единицы, такой как, например, растительная ткань, орган растения или целое растение.

[061] "Культура растительных клеток" означает культуры единиц растения, таких как, например, протопласты, клетки в клеточной культуре, клетки в растительных тканях, пыльца, пыльцевые трубки, семязачатки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

[062] "Растительный материал" относится к листьям, стеблям, корням, цветкам или частям цветков, плодам, пыльце, яйцеклеткам, зиготам, семенам, черенкам, клеточным или тканевым культурам или любой другой части или продукту растения.

[063] "Орган растения" представляет собой отдельную и визуально структурированную и дифференцированную часть растения, такую как корень, стебель, листок, цветковая почка или зародыш.

[064] Термин "растительная ткань", используемый в данном документе, означает группу растительных клеток, организованных в структурную и функциональную единицу. Включена любая ткань растения *in planta* или в культуре. Данный термин включает без ограничения целые растения, органы растений, семена растений, тканевую культуру и любые группы растительных клеток, организованных в структурные и/или функциональные единицы. Использование данного термина в сочетании с любым конкретным типом растительной ткани, перечисленным выше или иным образом охваченным данным определением, или при его отсутствии не предполагается как исключаящее любой другой тип растительной ткани. Например, "тапетум" представляет собой ткань внутри спорангиев, в частности пыльников, растений кукурузы, которая обеспечивает питание для растущих спор.

[065] "Полинуклеотид" относится к полимеру, состоящему из большого числа мономеров-нуклеотидов, ковалентно связанных в цепь. Такие "полинуклеотиды" включают ДНК, РНК, модифицированные олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды, содержащие основания, которые не являются типичными для биологической РНК или ДНК, такие как 2'-О-метилованные олигонуклеотиды) и т. п. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или полинуклеотид могут являться одонитевыми, двухнитевыми, многонитевыми или представлять собой их комбинацию. Если не указано иное, то конкретная нуклеиновая кислота или полинуклеотид по настоящему изобретению необязательно содержат или кодируют комплементарные полинуклеотиды дополнительно к любому явным образом указанному полинуклеотиду.

[066] "Полинуклеотид, представляющий интерес" относится к любому полинуклеотиду, который в случае перенесения в организм, например растение, придает организму необходимую характеристику, такую как устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к гербицидам, устойчивость к антибиотикам, улучшенная питательная ценность, улучшенные показатели в производственном процессе, продуцирование коммерчески ценных ферментов или метаболитов или измененная репродуктивная способность.

[067] "Промотор" представляет собой нетранслируемую последовательность ДНК выше кодирующего участка, которая содержит сайт связывания для РНК-

полимеразы и инициирует транскрипцию ДНК. Промоторный участок может также содержать другие элементы, которые выступают в качестве регуляторов экспрессии генов.

[068] “Предпочтительная экспрессия” относится к экспрессии генных продуктов,

5 которые предпочтительно экспрессируются на более высоком уровне в одной или нескольких растительных тканях (пространственное ограничение) и/или на одном или нескольких этапах развития растения (временное ограничение), в то время как в других тканях/этапах развития уровень экспрессии является сравнительно низким.

[069] Термин "рекомбинантный", используемый в данном документе, относится к

10 форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), или белка, или организма, которая обычно не будет встречаться в природе и которая как таковая была создана посредством вмешательства человека. Термин "молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты", используемый в данном документе, означает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую комбинацию полинуклеотидов, которые в
15 природе не встречаются вместе и являются результатом вмешательства человека, например, молекулу нуклеиновой кислоты, которая состоит из комбинации по меньшей мере двух полинуклеотидов, гетерологичных друг другу, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая была синтезирована искусственно, например полинуклеотид, синтезированный с помощью собранной нуклеотидной
20 последовательности, и содержит полинуклеотид, отличающийся от полинуклеотида, который будет в норме существовать в природе, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, искусственно введенный в геномную ДНК клетки-хозяина, и ассоциированную фланкирующую ДНК генома клетки-хозяина.

Другим примером молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты является
25 молекула ДНК, полученная в результате вставки трансгена в геномную ДНК растения, что в конечном итоге может приводить к экспрессии молекулы рекомбинантной РНК или белка в данном организме. Термин "рекомбинантное растение", используемый в данном документе, означает растение, которое обычно не будет существовать в природе, и оно является результатом вмешательства
30 человека и содержит трансген или гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, введенную в его геном. В результате такого изменения генома рекомбинантное растение явным образом отличается от родственного растения дикого типа.

[070] Под "регуляторной последовательностью" или "регуляторным элементом" и т. п. в данном документе понимается нуклеотидная последовательность, которая

контролирует экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности, обеспечивая распознавание РНК-полимеразы и других факторов, необходимых для правильной транскрипции, и как правило расположена выше (в 5'-направлении) кодирующей последовательности. "Регуляторные последовательности" включают 5'-регуляторные последовательности, расположенные проксимально и более дистально перед связанным кодирующим участком, которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию связанной кодирующей последовательности. "Регуляторные последовательности" могут дополнительно включать 3'-последовательности, в том числе 3'-нетранслируемые и/или 3'-нетранскрибируемые последовательности, расположенные ниже связанного кодирующего участка, и могут включать сайт терминации транскрипции, т. е. терминаторы. "Регуляторные последовательности" могут включать энхансеры, промоторы, нетранслируемые лидерные последовательности, интроны и сигнальные последовательности полиаденилирования. Они включают природные и синтетические последовательности, а также последовательности, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и природных последовательностей. "Энхансер" представляет собой последовательность ДНК, которая может стимулировать активность промотора, и он может представлять собой природный элемент промотора или гетерологичный элемент, введенный для повышения уровня тканевой специфичности промотора. Он способен работать в обеих ориентациях (нормальной или перевернутой) и способен функционировать даже при перемещении вверх или вниз от промотора. Примеры энхансеров включают, среди прочего, энхансер вируса мозаики норичника (eFMV) и энхансер вируса мозаики цветной капусты (e35S). Значение термина "регуляторные последовательности" включает "инициирующие транскрипцию" или "промоторные" последовательности и "промоторные регуляторные последовательности". Эти термины могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[071] "Регуляторные элементы" относятся к последовательностям, вовлеченным в контроль экспрессии нуклеотидной последовательности. Регуляторные элементы предусматривают промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, представляющей интерес, и сигналы терминации. Как правило, они охватывают также последовательности, необходимые для надлежащей трансляции нуклеотидной последовательности.

[072] “Специфическая экспрессия” представляет собой экспрессию продуктов генов, ограниченную одной или несколькими тканями растения (пространственное ограничение) и/или одной или несколькими этапами развития растения (временное ограничение).

5 **[073]** Выражение “тканеспецифичный промотор” относится к регулируемым промоторам, которые экспрессируются не во всех растительных клетках, а только в одном или нескольких типах клеток в специфических органах (например листьях, корнях или семенах), специфических тканях (например, зародыше или семядоле) или специфических типах клеток (например, клетках паренхимы листьев или

10 запасающих клетках семян). Оно также включает промоторы, которые являются временно регулируемыми, например, в начале или в конце эмбриогенеза, во время созревания плодов в развивающихся семенах или плодах, в полностью дифференцированном листе или в начале старения.

[074] “Транскрипционная кассета” будет содержать в 5'-3' направлении транскрипции

15 участок инициации транскрипции и трансляции, представляющую интерес последовательность ДНК и участок терминации транскрипции и трансляции, функционирующий в растениях. Участок терминации может происходить из одного источника с участком инициации транскрипции, может происходить из одного источника с представляющей интерес последовательностью ДНК, или может быть

20 получен из другого источника.

[075] “Сайт инициации транскрипции” представляет собой положение, окружающее первый нуклеотид, являющийся частью транскрибируемой последовательности, который также определяется как положение +1. Относительно этого сайта пронумерованы все остальные последовательности гена и его регулирующие

25 участки. Последовательности, расположенные по ходу транскрипции (т. е. дополнительные последовательности, кодирующие белок в 3'-направлении), обозначаются как положительные, а последовательности, расположенные против хода транскрипции (в основном из регулирующих участков в 5'-направлении) обозначаются как отрицательные.

30 **[076]** “Транзиентная трансформация” в контексте полинуклеотида означает, что полинуклеотид введен в клетку и не интегрирован в геном клетки. Транзиентную трансформацию можно выявить, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или вестерн-блоттинга, с помощью которых можно выявить присутствие пептида или полипептида, кодируемого одной или

несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, введенными в организм.

Стабильную трансформацию клетки можно выявлять, например, в анализе с использованием Саузерн-блот-гибридизации геномной ДНК клетки с последовательностями нуклеиновой кислоты, которые специфически

5 гибридируются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, введенной в организм (например, растение). Стабильную трансформацию клетки можно выявить, например, в анализе с использованием нозерн-блот-гибридизации РНК клетки с последовательностями нуклеиновой кислоты, которые специфически гибридируются с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, введенной в растение или другой организм. Стабильную трансформацию клетки также можно обнаруживать, например, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или другой реакции амплификации, хорошо известной из уровня техники, с использованием специфических последовательностей праймеров, которые гибридируются с целевой(ыми) 10 последовательностью(ями) молекулы нуклеиновой кислоты, приводя к амплификации целевой последовательности, которую могут обнаруживать согласно стандартным методикам. Трансформацию также можно обнаруживать с помощью прямого секвенирования и/или протоколов гибридизации, хорошо известных из уровня техники.

20 **[077]** "Трансформация" представляет собой процесс введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку- или организм-хозяин. В конкретных вариантах осуществления "трансформация" означает стабильную интеграцию молекулы ДНК в геном (ядерный или пластидный) представляющего интерес организма.

[078] "Трансформированный/трансгенный/рекомбинантный" относится к организму-хозяину, такому как бактерия или растение, в который была введена гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты. Молекулу нуклеиновой кислоты можно стабильно интегрировать в геном хозяина, или же молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в виде внехромосомной молекулы. Такая внехромосомная молекула может быть аутореплицируемой. Подразумевается, что 25 трансформированные клетки, ткани или растения охватывают не только конечный продукт процесса трансформации, но также и их трансгенное потомство. Термины "нетрансформированный", "нетрансгенный" или "нерекомбинантный" хозяин относятся к организму дикого типа, например, бактерии или растению, не содержащим гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. 30

[079] “Вектор” включает, в числе прочего, любую плазмиду, космиду, фаг или бинарный вектор для *Agrobacterium* в дву- или односторонней линейной или кольцевой форме, который может быть самопередающимся или мобилизуемым, или не быть таковым, и который может трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина либо путем интеграции в геном клетки, либо за счет существования его внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации). В частности, включены челночные векторы, с помощью которых предназначенный носитель ДНК может, естественным или спланированным образом, реплицироваться в двух различных организмах-хозяевах, которые могут быть выбраны из актиномицетов и родственных видов, бактерий и эукариот (например, клеток высших растений, млекопитающих, дрожжей или грибов).

[080] Настоящее изобретение в целом относится к регуляторным полинуклеотидам, по меньшей мере часть которых характеризуется функцией инициации транскрипции, управляющей экспрессией функционально связанного полинуклеотида, кодирующего белок, практически во всех тканях растения, при этом по сути исключая экспрессию в мужских репродуктивных тканях, таких как ткань пыльца и/или ткань метелки. Регуляторные полинуклеотиды можно использовать в химерных конструкциях, кассетах экспрессии, рекомбинантных векторах и т. п. для управления экспрессией представляющего интерес белка, например инсектицидного белка, в тканях растений, которыми обычно питаются целевые вредители, и устранения или уменьшения накопления инсектицидного белка в тканях, которыми обычно не питаются насекомые-вредители, или в тех тканях, которые могут быть подвержены воздействию инсектицидного белка, например, в ткани пыльца или метелки.

[081] Промоторные последовательности получают путем клонирования геномных последовательностей, которые гомологичны последовательностям cDNA, экспрессируемым в тканях, отличных от ткани пыльца, т. е. последовательностям cDNA, “не относящимся к тканям пыльца”. Геномные последовательности могут быть получены при помощи способов гибридизации или с использованием способов ПЦР для удлинения последовательности либо в 5’-, либо в 3’-направлении от известной последовательности (иногда это называется “прогулкой по геному”). Например, чтобы получить геномные последовательности 5’ в отношении известной последовательности cDNA, создают праймеры к последовательности

вблизи 5'-конца cDNA. Геномная библиотека создается с 5'-концом каждой последовательности геномной ДНК, лигированной с коротким олигонуклеотидным адаптером. ПЦР с праймером, гибридизующимся с адаптерной последовательностью, и 5'-праймером последовательности cDNA, не относящейся к тканям пыльцы, обеспечивает амплификацию геномной последовательности, расположенной на 5'-конце, с гомологичной последовательностью последовательности, не относящейся к тканям пыльцы. Последовательности ДНК, полученные в результате "прогулки по геному", секвенируют, и, если необходимы дополнительные 5'-участки, процесс повторяют с праймерами теперь на 5'-конце самого длинного полученного клона. Геномные последовательности, гомологичные последовательностям cDNA, не относящимся к тканям пыльцы, также получают путем гибридизации в условиях высокой жесткости. Условия высокой жесткости выбирают для гибридизации зонда, полученного из последовательности cDNA, не относящейся к тканям пыльцы, для гибридизации с его гомологичной последовательностью в геномной ДНК. Геномная ДНК содержится в библиотеке геномной ДНК из последовательностей геномной ДНК маиса размером 5-20 т.п.о. в векторе фага лямбда. Геномные клоны, которые гибридизуются с cDNA, не относящейся к тканям пыльцы, выделяют и секвенируют.

[082] Промоторы по настоящему изобретению расположены в 5'-участке

последовательности cDNA, не относящейся к тканям пыльцы, непосредственно выше кодирующей последовательности. Размер регуляторного участка предпочтительно составляет в диапазоне приблизительно от 2 т.п.о. до 8 т.п.о. и включает 5'-нетранскрибируемую последовательность, в частности 5'-нетранскрибируемую последовательность и 5'-UTR, а также всю или часть нуклеотидной последовательности, представляющей первый интрон. Промоторы, приведенные в качестве примеров в настоящем документе, представлены под SEQ ID NO:1-11. Регуляторные последовательности по настоящему изобретению могут дополнительно включать часть 3'-последовательности, которая начинается сразу после кодирующей последовательности стоп-кодона трансляции cDNA, не относящейся к тканям пыльцы, включая транскрибируемую, но не транслируемую последовательность (UTR) и нетранскрибируемую последовательность, которая функционирует как терминатор транскрипции и сигнал полиаденилирования. В частности, 3'-последовательность составляет в диапазоне от приблизительно 1,0

т.п.о. до приблизительно 2,5 т.п.о. Терминаторы, приведенные в качестве примеров в настоящем документе, представлены под SEQ ID NO:12-20.

[083] Геномные клоны могут включать последовательности интронов, не обнаруженные в клонах mRNA или cDNA. Геномные последовательности могут дополнительно содержать 5'-нетранслируемые последовательности, 3'-нетранслируемые последовательности и 5'- и 3'-регуляторные последовательности. Промоторные последовательности находятся в геномной последовательности с 5'-конца последовательности cDNA. Клонировать геномные последовательности, которые гомологичны последовательностям cDNA, не относящимся к тканям пыльцы. Последовательности, которые находятся на 5'-конце последовательности, гомологичной последовательности cDNA, в данном документе называются 5'-фланкирующим участком, который содержит промоторный участок.

[084] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конструкции химерной ДНК, которая содержит последовательность, кодирующую инсектицидный белок, функционально связанную с регуляторной последовательностью, по меньшей мере часть которой выполняет функцию инициации транскрипции, управляя экспрессией кодируемого инсектицидного белка, практически во всех тканях растения, за исключением мужских репродуктивных тканей, таких как ткань пыльцы и/или метелки, таким образом, что в ткани пыльцы и/или метелки продукт экспрессии присутствует в малых количествах или отсутствует. Последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть представлены в виде ДНК или РНК, как указано; раскрытие одного обязательно определяет другое, как известно специалистам в данной области. Кроме того, раскрытие данной последовательности нуклеиновой кислоты обязательно определяет точную комплементарность этой последовательности, как известно специалисту в данной области.

[085] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена кассета экспрессии, содержащая промотор, содержащий нуклеотидную последовательность, а) характеризующуюся от по меньшей мере 95% идентичности до по меньшей мере 99% идентичности любой из SEQ ID NO:1-11; или b) любой из SEQ ID NO:1-11, функционально связанной с представляющим интерес гетерологичным полинуклеотидом, который функционально связан с 3'-нетранслируемым участком, включающей сигнал полиаденилирования, где гетерологичный полинуклеотид функционально транскрибируется в ткани

трансгенного растения, не являющейся тканью пыльцы. В других вариантах осуществления гетерологичный полинуклеотид кодирует инсектицидный белок или двухцепочечную РНК (dsRNA). В других вариантах осуществления инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3.

- 5 **[086]** В других вариантах осуществления инсектицидный белок Cry выбран из группы, состоящей из Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ai, Cry1Aj, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bc, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Bg, Cry1Bh, Cry1Bi, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Dc, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1Hc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ig, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry1Jd, Cry1Ka, Cry1La, Cry1Ma, Cry1Na, Cry1Nb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah, Cry2Ai, Cry2Aj, Cry2Ak, Cry2Al, Cry2Ba, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Ca, Cry4Cb, Cry4Cc, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ad, Cry5Ba, Cry5Ca, Cry5Da, Cry5Ea, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ac, Cry7Ba, Cry7Bb, Cry7Ca, Cry7Cb, Cry7Da, Cry7Ea, Cry7Fa, Cry7Fb, Cry7Ga, Cry7Gb, Cry7Gc, Cry7Gd, Cry7Ha, Cry7Ia, Cry7Ja, Cry7Ka, Cry7Kb, Cry7La, Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ac, Cry8Ad, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha, Cry8Ia, Cry8Ib, Cry8Ja, Cry8Ka, Cry8Kb, Cry8La, Cry8Ma, Cry8Na, Cry8Pa, Cry8Qa, Cry8Ra, Cry8Sa, Cry8Ta, Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Dc, Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, Cry9Ed, Cry9Ee, Cry9Fa, Cry9Ga, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry14Ab, Cry15Aa, Cry16Aa, Cry17Aa, Cry18Aa, Cry18Ba, Cry18Ca, Cry19Aa, Cry19Ba, Cry19Ca, Cry20Aa, Cry20Ba, Cry21Aa, Cry21Ba, Cry21Ca, Cry21Da, Cry21Ea, Cry21Fa, Cry21Ga, Cry21Ha, Cry22Aa, Cry22Ab, Cry22Ba, Cry22Bb, Cry23Aa, Cry24Aa, Cry24Ba, Cry24Ca, Cry25Aa, Cry26Aa, Cry27Aa, Cry28Aa, Cry29Aa, Cry29Ba, Cry30Aa, Cry30Ba, Cry30Ca, Cry30Da, Cry30Db, Cry30Ea, Cry30Fa, Cry30Ga, Cry31Aa, Cry31Ab, Cry31Ac, Cry31Ad, Cry32Aa, Cry32Ab, Cry32Ba, Cry32Ca, Cry32Cb, Cry32Da, Cry32Ea, Cry32Eb, Cry32Fa, Cry32Ga, Cry32Ha, Cry32Hb, Cry32Ia, Cry32Ja, Cry32Ka, Cry32La, Cry32Ma, Cry32Mb, Cry32Na, Cry32Oa, Cry32Pa, Cry32Qa, Cry32Ra, Cry32Sa, Cry32Ta, Cry32Ua, Cry33Aa, Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac, Cry34Ba, Cry35Aa, Cry35Ab, Cry35Ac, Cry35Ba, Cry36Aa, Cry37Aa, Cry38Aa, Cry39Aa, Cry40Aa, Cry40Ba, Cry40Ca, Cry40Da, Cry41Aa, Cry41Ab, Cry41Ba, Cry42Aa, Cry43Aa, Cry43Ba, Cry43Ca, Cry43Cb, Cry43Cc, Cry44Aa, Cry45Aa, Cry46Aa, Cry46Ab, Cry47Aa, Cry48Aa, Cry48Ab,

Cry49Aa, Cry49Ab, Cry50Aa, Cry50Ba, Cry51Aa, Cry52Aa, Cry52Ba, Cry53Aa, Cry53Ab, Cry54Aa, Cry54Ab, Cry54Ba, Cry55Aa, Cry56Aa, Cry57Aa, Cry57Ab, Cry58Aa, Cry59Aa, Cry59Ba, Cry60Aa, Cry60Ba, Cry61Aa, Cry62Aa, Cry63Aa, Cry64Aa, Cry65Aa, Cry66Aa, Cry67Aa, Cry68Aa, Cry69Aa, Cry69Ab, Cry70Aa, Cry70Ba, Cry70Bb, Cry71Aa, Cry72Aa и Cry73Aa. В еще других вариантах осуществления белок Cry представляет собой белок Cry1. В других вариантах осуществления белок Cry1 представляет собой белок Cry1A. В еще других вариантах осуществления белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai.

10 **[087]** В других вариантах осуществления инсектицидный белок Vip3, кодируемый гетерологичным функционально связанным с промотором по настоящему изобретению, выбран из группы, состоящей из Vip3Aa1, Vip3Aa2, Vip3Aa3, Vip3Aa4, Vip3Aa5, Vip3Aa6, Vip3Aa7, Vip3Aa8, Vip3Aa9, Vip3Aa10, Vip3Aa11, Vip3Aa12, Vip3Aa13, Vip3Aa14, Vip3Aa15, Vip3Aa16, Vip3Aa17, Vip3Aa18, 15 Vip3Aa19, Vip3Aa20, Vip3Aa21, Vip3Aa22, Vip3Aa23, Vip3Aa24, Vip3Aa25, Vip3Aa26, Vip3Aa27, Vip3Aa28, Vip3Aa29, Vip3Aa30, Vip3Aa31, Vip3Aa32, Vip3Aa33, Vip3Aa34, Vip3Aa35, Vip3Aa36, Vip3Aa37, Vip3Aa38, Vip3Aa39, Vip3Aa40, Vip3Aa41, Vip3Aa42, Vip3Aa43, Vip3Aa44, Vip3Ab1, Vip3Ab2, Vip3Ac1, Vip3Ad1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Af2, Vip3Af3, 20 Vip3Ag1, Vip3Ag2, Vip3Ag3, HM117633, Vip3Ag4, Vip3Ag5, Vip3Ah1, Vip3Ba1, Vip3Ba2, Vip3Bb1, Vip3Bb2 и Vip3Bb3. В еще других вариантах осуществления белок Vip3 представляет собой белок Vip3A. В других вариантах осуществления белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa. В других вариантах осуществления белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa19 или Vip3Aa20.

25 **[088]** В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение, в котором функционально транскрибирован гетерологичный полинуклеотид по настоящему изобретению, представляет собой однодольное растение. В других вариантах осуществления однодольное растение представляет собой растение маиса. В других вариантах осуществления растение маиса представляет собой инбредное растение 30 маиса или гибридное растение маиса. В некоторых вариантах осуществления ткань растения маиса, в которой гетерологичный полинуклеотид функционально экспрессируется, представляет собой ткань листа, рыльца или шелухи.

[089] В некоторых вариантах осуществления 3'-нетранслируемый участок кассеты экспрессии по настоящему изобретению содержит терминаторную

последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:12-20. В других вариантах осуществления кассета экспрессии содержит SEQ ID NO:29.

[090] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему кассету экспрессии по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления рекомбинантный вектор представляет собой бинарный вектор, способный функционировать во многих организмах. В других вариантах осуществления организм представляет собой бактерию или растение. В других вариантах осуществления бинарный вектор содержит любую из SEQ ID NO:21-28.

[091] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к растительной клетке, трансформированной рекомбинантным вектором или кассетой экспрессии по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления рекомбинантный вектор или кассета экспрессии временно экспрессируются в растительной клетке. В других вариантах осуществления рекомбинантный вектор или кассета экспрессии по настоящему изобретению стабильно интегрированы в геном растительной клетки. В других вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку однодольного растения. В других вариантах осуществления клетка однодольного растения представляет собой растительную клетку маиса. В других вариантах осуществления кассета экспрессии содержит последовательность кассеты экспрессии в любой из SEQ ID NO:21-28. В других вариантах осуществления кассета экспрессии содержит SEQ ID NO:29.

[092] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к трансгенному растению, содержащему кассету экспрессии или вектор по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления кассета экспрессии или вектор или их часть стабильно интегрированы в геном трансгенного растения. В других вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой однодольное растение. В еще других вариантах осуществления однодольное трансгенное растение представляет собой трансгенное растение маиса. В других вариантах осуществления трансгенное растение маиса представляет собой инбредное растение маиса или гибридное растение маиса. В других вариантах осуществления трансгенное растение кукурузы экспрессирует представляющий интерес белок на функциональных уровнях в любой ткани, не являющейся тканью пыльцы. В еще других вариантах осуществления ткань, в которой представляющий

интерес белок экспрессируется на функциональных уровнях, представляет собой ткань листа, рыльца или шелухи.

[093] В других вариантах осуществления представляющий интерес белок, который экспрессируется в трансгенном растении на функциональных уровнях в любой ткани, не являющейся тканью пыльцы, представляет собой белок Cry или белок Vip3. В других вариантах осуществления белок Cry или белок Vip3 выбран из перечня белков Cry и Vip3, описанных выше. В других вариантах осуществления белок Cry представляет собой белок Cry1. В других вариантах осуществления белок Cry1 представляет собой белок Cry1A. В еще других вариантах осуществления белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или белок Cry1Ai. В еще других вариантах осуществления белок Vip3 представляет собой белок Vip3A. В других вариантах осуществления белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa. В еще других вариантах осуществления белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa19 или Vip3Aa20.

[094] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к трансгенным семенам любого трансгенного растения по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления трансгенное семя содержит кассету экспрессии или вектор или его часть по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления трансгенное семя представляет собой семя маиса. В других вариантах осуществления семя маиса функционирует как средство размножения маиса. В других вариантах осуществления семя трансгенного маиса функционирует как собранное зерно.

[095] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: а) последовательности, представленной под любой из SEQ ID NO:1-20; б) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью а); и с) нуклеотидной последовательности, содержащей фрагмент нуклеотидной последовательности а), где фрагмент сохраняет функцию нуклеотидной последовательности а); где молекула нуклеиновой кислоты инициирует функциональную транскрипцию или завершает функциональную транскрипцию представляющего интерес функционально связанного полинуклеотида в ткани трансгенного растения, которая не является тканью пыльцы.

[096] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес

полинуклеотид, который функционально связан с выделенной молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирует инсектицидный белок или двухцепочечную РНК (dsRNA). В других вариантах осуществления инсектицидный белок представляет собой белок Cгу или белок Vip3. В других вариантах осуществления белок Cгу или белок Vip3 выбран из перечня белков Cгу и Vip3, описанных выше. В других вариантах осуществления белок Cгу представляет собой белок Cгу1. В других вариантах осуществления белок Cгу1 представляет собой белок Cгу1A. В других вариантах осуществления белок Cгу1A представляет собой белок Cгу1Ab или Cгу1Ai. В еще других вариантах осуществления белок Vip3 представляет собой белок Vip3A. В другом варианте осуществления белок Vip3A представляет собой белок Viip3Aa. В других вариантах осуществления белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa19 или Vip3Aa20.

[097] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой

кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:1. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:1, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:12.

[098] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой

кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:2. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:2, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

[099] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой

кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:3. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:3, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:17.

[0105] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:9. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:9, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:18.

[0106] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:10. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:10, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:19.

[0107] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:11. В других вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность промотора, представленную под SEQ ID NO:11, и нуклеотидную последовательность терминатора, представленную под SEQ ID NO:20.

[0108] В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению инициирует функциональную транскрипцию или завершает функциональную транскрипцию представляющего интерес функционально связанного полинуклеотида в любой ткани трансгенного растения кукурузы, отличной от ткани пыльцы.

[0109] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу экспрессии представляющего интерес белка или полинуклеотида в трансгенном растении или трансгенной растительной клетке, включающему введение в растение или растительную клетку кассеты экспрессии или вектора по настоящему изобретению, содержащего промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес

белок или полинуклеотид, где промотор содержит любую из SEQ ID NO:1-11, и где представляющий интерес белок или полинуклеотид функционально экспрессируется в ткани трансгенного растения, которая не является тканью пыльцы. В других вариантах осуществления кассета экспрессии или вектор также содержат последовательность терминатора, функционально связанную с гетерологичным полинуклеотидом, который содержит любую из SEQ ID NO:12-20.

[0110] В других вариантах осуществления способа экспрессии представляющего интерес белка или полинуклеотида в трансгенном растении или клетке трансгенного растения представляющий интерес белок представляет собой инсектицидный белок, или представляющий интерес полинуклеотид представляет собой dsRNA, которая характеризуется инсектицидной активностью. В других вариантах осуществления инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3. В других вариантах осуществления белок Cry или белок Vip3 выбран из перечня белков Cry и Vip3, описанных выше. В других вариантах осуществления белок Cry представляет собой белок Cry1. В еще других вариантах осуществления белок Cry1 представляет собой белок Cry1A. В других вариантах осуществления белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai. В еще других вариантах осуществления белок Vip3 представляет собой белок Vip3A. В другом варианте осуществления белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa. В других вариантах осуществления белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa19 или Vip3Aa20.

[0111] В других вариантах осуществления способа экспрессии представляющего интерес белка или полинуклеотида в трансгенном растении или в клетке трансгенного растения трансгенное растение представляет собой трансгенное растение маиса. В других вариантах осуществления трансгенное растение маиса представляет собой инбредное растение маиса или гибридное растение маиса. В еще других вариантах осуществления ткань, в которой представляющий интерес белок экспрессируется на функциональных уровнях в трансгенном растении маиса, представляет собой ткань листа, рыльца или шелухи.

[0112] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для дополнительного определения последовательностей, необходимых для экспрессии в любой ткани, не являющейся тканью пыльцы, а также тех регуляторных последовательностей, которые влияют на общий уровень экспрессии, могут быть выполнены делеции в промоторном участке, не относящейся к тканям пыльцы. Делеции выполняют в 5'-фланкирующем участке каждого геномного клона, не

относящегося к тканям пыльцы. В большинстве промоторов 500-1000 пар оснований (п. о.) 5'-фланкирующей последовательности достаточно для активности промотора, включая тканеспецифическую активность. Делеции 5'-фланкирующего участка могут приводить к промоторным участкам размером примерно 50 п. о., 100 п. о., 250 п. о., 500 п. о., 750 п. о. и 1000 п. о. или более. Эти делеционные последовательности промотора служат двоякой цели. Делеции обеспечивают дополнительное картирование регуляторных последовательностей в пределах 5'-фланкирующей последовательности каждого геномного клона, не относящегося к тканям пыльцы. Кроме того, делеции предоставляют набор промоторных и регуляторных последовательностей, которые различаются по уровням экспрессии и паттернам экспрессии, что обеспечивает дополнительную гибкость при выборе промоторных последовательностей для соответствующей регуляции генов.

[0113] Специалисту в данной области также ясно, что мутации, вставки, делеции и/или замены одного или нескольких нуклеотидов могут быть введены в нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1-11 с применением способов, известных в уровне техники. Кроме того, шаффлинг последовательностей по настоящему изобретению может дать новые и разнообразные нуклеотидные последовательности. Например, SEQ ID NO:3-5 представляют собой варианты SEQ ID NO:1, которые имеют одну или несколько замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO:2.

[0114] Для исследования функции вариантных последовательностей ДНК согласно настоящему изобретению, таких как делеционные фрагменты SEQ ID NO:1-11, представляющую интерес последовательность функционально связывают с селектируемым или видимым маркерным геном, и экспрессию маркерного гена исследуют в анализах временной экспрессии в выделенных тканях, таких как ткань листа, или клетках, или путем стабильной трансформации в растения. Специалистам в данной области известно, что последовательности ДНК, способные управлять экспрессией связанной кодирующей последовательности, построены модульным образом. Соответственно, уровни экспрессии более коротких фрагментов ДНК могут отличаться от уровня экспрессии самого длинного фрагмента и могут отличаться друг от друга. Например, делеция подавляющего элемента, расположенного выше, приведет к увеличению уровней экспрессии связанной кодирующей последовательности, в то время как делеция активирующего элемента снизит уровни экспрессии связанной кодирующей последовательности. Специалистам в данной области также известно, что делеция специфичных в отношении развития или

тканеспецифичных элементов будет приводить к временному или пространственному изменению профиля экспрессии связанной кодирующей последовательности.

- 5 **[0115]** В другом варианте осуществления настоящего изобретения последовательности ДНК и геномной ДНК, гомологичные SEQ ID NO:1-11, могут быть выделены из другой идиоплазмы маиса с применением способов гибридизации или ПЦР, хорошо известных в уровне техники. Выделенные последовательности могут быть идентичны SEQ ID NO:1-11 или они могут быть по сути идентичны SEQ ID NO:1-11. Для того, чтобы последовательности, полученные из другой идиоплазмы маиса, 10 были функционально идентичными последовательностям, описанным в настоящем документе, необязательно чтобы они содержали идентичные нуклеотидные последовательности. Некоторые делеции, добавления и замены нуклеотидов могут не влиять или оказывать лишь незначительное влияние на экспрессию генов. Предпочтительная выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему 15 изобретению содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с любой из нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO:1-11. Более предпочтительная молекула выделенной нуклеиновой кислоты содержит 20 нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO:1-11. Еще более предпочтительная молекула выделенной нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO:1-11. 25 Еще более предпочтительная молекула выделенной нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична любой из нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO:1-11. Наиболее предпочтительная выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO:1-11.
- 30 **[0116]** В других вариантах осуществления последовательности cDNA и геномной ДНК могут быть клонированы из других растений, которые представляют собой гомологи генов и промоторов маиса, не относящихся к тканям пыльцы. Такие гомологи обеспечивают получение дополнительных промоторов, не относящихся к тканям пыльцы, применимых для регуляции множества генов в тканях растений, отличных

от пыльцы. Гибридизация с использованием cDNA маиса и геномных последовательностей или их частей используется для скрининга гомологичных или по сути идентичных последовательностей в геномах других растений. Такие последовательности могут содержать только подмножество нуклеотидов SEQ ID NO:1-11. Предпочтительная длина гомологии составляет 20 пар оснований (п. о.), более предпочтительно 50 п. о. в длину и наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 п. о. в длину. В одном варианте осуществления настоящего изобретения гибридационный зонд получают из любой из SEQ ID NO:1-11 или ее частей. Гибридизацию таких последовательностей можно проводить в условиях высокой жесткости. В качестве альтернативы, чтобы допустить некоторое несоответствие в последовательностях для выявления более низких степеней сходства (гетерологическое зондирование), можно использовать условия низкой или умеренной жесткости. Обычно зонд составляет менее чем приблизительно 1000 нуклеотидов в длину, предпочтительно менее чем 500 нуклеотидов в длину.

15 **[0117]** В других вариантах осуществления настоящего изобретения cDNA и геномные последовательности выделяют путем создания праймеров, содержащих последовательности в пределах любой из SEQ ID NO:1-11. Праймеры можно использовать в реакции ПЦР с cDNA или геномной ДНК из растения для получения гомологичных последовательностей или последовательностей, в значительной

20 степени идентичных любой из SEQ ID NO:1-11.

Конструкция кассет экспрессии

25 **[0118]** Конструируют кассеты экспрессии, содержащие 5'-фланкирующие последовательности геномных клонов, не относящихся к тканям пыльцы. В вариантах осуществления настоящего изобретения промоторный участок, используемый в каждой кассете экспрессии, включает 5'-фланкирующий участок до начала трансляции включительно. Начало трансляции обозначается первой ATG открытой рамки считывания (ORF), находящейся в cDNA и гомологичной геномной

30 последовательности. Таким образом, промоторный участок может включать 5'-нетранслируемую лидерную последовательность, а также сайт начала транскрипции, коровый промотор и дополнительные регуляторные элементы. В других вариантах осуществления настоящего изобретения конструируют кассеты экспрессии, содержащие 5'-фланкирующую последовательность геномных клонов, не

относящихся к тканям пыльцы, до сайта инициации транскрипции включительно. Сайт инициации транскрипции может быть определен первым нуклеотидом самого длинного полученного клона cDNA. Кроме того, сайт инициации транскрипции может быть дополнительно определен с использованием способов, хорошо известных в уровне техники, включая RACE PCR, картирование защиты от РНКазы и анализ удлинения праймера.

[0119] Кассеты экспрессии могут дополнительно содержать терминатор транскрипции ниже (3') промотора. Для применения в кассетах экспрессии доступны различные терминаторы транскрипции. Терминатор транскрипции отвечает за терминацию транскрипции за пределами трансгена и соответствующее полиаденилирование mRNA транскрипта mRNA. Соответствующие терминаторы транскрипции представляют собой таковые, которые, как известно, функционируют в растениях и включают терминатор 35S CaMV, терминатор гена *tml*, терминатор гена нопалинсинтазы и терминатор гена *rbcS* E9 гороха. Они могут применяться как у однодольных, так и у двудольных растений. В дополнение, можно применять нативный терминатор транскрипции гена. Например, можно использовать 3'-фланкирующую последовательность, содержащую геномную последовательность 3' к участку, гомологичной клону cDNA, не относящемуся к тканям пыльцы. Примеры таких терминаторов включают любую из SEQ ID NO:12-20.

[0120] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичную кодирующую последовательность, например кодирующую последовательность с инсектицидной активностью, последовательность, кодирующую видимый маркер, или последовательность, кодирующую селективируемый маркер, клонируют между промотором по настоящему изобретению и терминатором транскрипции, посредством чего гетерологичная кодирующая последовательность функционально связана с промотором, а терминатор транскрипции оперативно связан с гетерологичной кодирующей последовательностью. Примеры видимых маркеров, применимых по настоящему изобретению, включают без ограничения β -глюкуронидазу (GUS), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), люциферазу (LUC) и белки с флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) из *Aequora victoria*. В принципе, для этой цели подходят многие другие белки, при условии, что белок не мешает основным функциям растений. Дополнительные примеры гетерологичных кодирующих последовательностей, применимых по настоящему изобретению, включают без ограничения

последовательности, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, устойчивость к вирусам, устойчивость к насекомым, устойчивость к болезням или устойчивость к другим вредителям, устойчивость к гербицидам, улучшенную пищевую ценность, улучшенные характеристики при промышленном способе или измененную репродуктивную способность. В других вариантах осуществления настоящего изобретения ген, кодирующий устойчивость к насекомым, питающимся тканями растений, не являющимися тканями пыльцы, клонируют между промотором по настоящему изобретению и терминатором, известным в уровне техники или по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящего изобретения последовательность, кодирующая функциональную РНК, такую как антисмысловая РНК, смысловая РНК для смысловой супрессии или двухцепочечная РНК, также может быть клонирована между промотором и терминатором транскрипции.

[0121] Было обнаружено, что многочисленные последовательности усиливают

экспрессию генов внутри транскрипционной единицы, и эти последовательности можно использовать в сочетании с промоторами по настоящему изобретению для повышения их экспрессии в трансгенных растениях. Было показано, что различные интронные последовательности усиливают экспрессию, в частности, в клетках однодольных растений. Например, также известно, что ряд нетранслируемых лидерных последовательностей, полученных из вирусов, усиливает экспрессию, и они особенно эффективны в клетках двудольных. В частности, было показано, что лидерные последовательности вируса табачной мозаики (TMV, "W-последовательность"), вируса хлоротичной пятнистости маиса (MCMV) и вируса мозаики люцерны (AMV) эффективны в усилении экспрессии (например, Gallie *et al. Nucl. Acids Res.* 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski *et al. Plant Molec. Biol.* 15: 65-79 (1990)). Промотор, не относящийся к тканям пыльцы, по настоящему изобретению может включать или быть модифицированным для включения одного или нескольких энхансерных элементов. В некоторых вариантах осуществления промотор может включать множество энхансерных элементов. Промоторы, содержащие энхансерные элементы, обеспечивают более высокие уровни транскрипции в тканях, отличных от тканей пыльцы, по сравнению с промоторами, не содержащими их. Подходящие энхансерные элементы для применения в растениях включают энхансерный элемент PCSIV (патент США № 5850019), энхансерный элемент CaMV 35S (патенты США № 5106739 и 5164316) и

энхансерный элемент FMV (Maiti et al. (1997) Transgenic Рез.6:143-156); активатор трансляции вируса табачной мозаики (TMV), описанный в заявке WO 87/07644, или вирус гравировки табака (TEV), описанный Carrington & Freed 1990, J. Virol. 64. 1590-1597, например, или интроны, например интрон adh1 маиса или интрон 1 актина риса. См. также PCT WO96/23898, WO2012/021794, WO2012/021797, WO2011/084370 и WO2011/028914.

Трансформация растений

- 10 **[0100]** Процедуры для трансформирования растений известны в уровне техники и подробно описаны в литературе. Неограничивающие примеры способов трансформации растений включают трансформацию с помощью доставки нуклеиновых кислот, опосредованной бактериями (например, с помощью *Agrobacterium*), доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки
- 15 нуклеиновых кислот, опосредованной карбидом кремния или микроиглами с нуклеиновыми кислотами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной липосомами, микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную циклодекстринами, электропорацию, трансформацию, опосредованную наночастицами, обработку ультразвуком, инфильтрацию, поглощение нуклеиновых
- 20 кислот, опосредованное PEG, а также любой другой электрический, химический, физический (механический) или биологический механизм, который приводит к введению нуклеиновой кислоты в растительную клетку, включая любую их комбинацию. Общие наставления по различным способам трансформации растений, известным в уровне техники, включают Miki *et al.* ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), страницы 67-88) и Rakowoczy-Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:849-858 (2002)).
- 25 **[0101]** Для трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, подходят бинарные векторы или векторы, несущие по меньшей мере одну граничную последовательность T-DNA, тогда как для прямого переноса генов (например, с помощью бомбардировки частицами и т. п.) подходит любой вектор, при этом можно применять линейную ДНК, содержащую только представляющую интерес конструкцию. В случае прямого переноса генов можно применять трансформацию
- 30

при помощи одного вида ДНК или котрансформацию (Schocher et al., *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)). В случае как прямого переноса генов, так и переноса, опосредованного *Agrobacterium*, трансформацию обычно (но не обязательно) выполняют с селективируемым маркером, который может представлять собой средство для позитивного отбора (фосфоманнозоизомераза, РМІ), которое обеспечивает устойчивость к антибиотику (канамицину, гигромицину или метотрексату) или гербициду (глифосату или глюфосинату). Однако выбор селективируемого маркера не является критически важным для настоящего изобретения.

[0102] Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, представляет собой способ, широко применяемый для трансформации растений в связи с высокой эффективностью трансформации и в связи с его широкой применимостью в отношении множества различных видов. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, как правило, предполагает перенос бинарного вектора, несущего чужеродную ДНК, представляющую интерес, в соответствующий штамм *Agrobacterium*, что может зависеть от набора генов *vir* штамма-хозяина *Agrobacterium*, расположенного либо в корезидентной Ti-плазмиде, либо в хромосоме (Uknes et al. (1993) *Plant Cell* 5:159-169). Перенос рекомбинантного бинарного вектора в *Agrobacterium* можно выполнять с помощью процедуры трехродительского скрещивания с применением *Escherichia coli*, несущей рекомбинантный бинарный вектор, хелперного штамма *E. coli*, несущего плазмиду, которая способна мобилизовать рекомбинантный бинарный вектор в целевом штамме *Agrobacterium*. В качестве альтернативы, рекомбинантный бинарный вектор можно переносить в *Agrobacterium* путем трансформации нуклеиновой кислоты (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

[0103] Двудольные, а также однодольные можно трансформировать с использованием *Agrobacterium*. Способы опосредованной *Agrobacterium* трансформации риса включают хорошо известные способы трансформации риса, такие как описанные в любом из следующего: европейская патентная заявка EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (Planta 199: 612-617, 1996); Chan et al. (Plant Mol Biol 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (Plant J 6 (2): 271-282, 1994), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены. В случае трансформации кукурузы предпочтительным способом является описанный или в Ishida et al. (Nat. Biotechnol 14(6): 745-50, 1996), или в Frame et al. (Plant

Physiol 129(1): 13-22, 2002), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены. Указанные способы также описаны в качестве примера в Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, в: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 и в Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225). Нуклеиновые кислоты или конструкция, подлежащие экспрессии, предпочтительно клонируют в вектор, который является подходящим для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, например pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Агробактерии, трансформированные таким вектором, затем можно применять известным способом для трансформации растений, таких как растения, применяемые в качестве модели, такие как *Arabidopsis*, или сельскохозяйственные культуры, такие как, в качестве примера, растения табака, например, посредством погружения истолоченных листьев или нарубленных листьев в раствор агробактерий и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* описана, например, Hagen and Willmitzer в Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 или известна, в частности, из F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; в Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

[0104] Трансформация растения с помощью рекомбинантной *Agrobacterium* обычно включает совместное культивирование *Agrobacterium* с эксплантатами из растения, и ее проводят в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. Трансформированную ткань регенерируют на селективной среде, содержащей маркер устойчивости к антибиотикам или гербицидам между граничными последовательностями T-DNA бинарной плазмиды.

[0105] Как обсуждалось ранее, другой способ трансформации растений, частей растений и растительных клеток включает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные ткани и клетки. См, например, патенты США №№ 4945050, 5036006 и 5100792. В общем случае этот способ предусматривает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные клетки при условиях, эффективных для проникновения через наружную поверхность клетки и обеспечения встраивания в ее внутреннюю часть. При использовании инертных частиц вектор можно вводить в клетку путем покрытия частиц вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту. В качестве

альтернативы, клетку или клетки можно окружить вектором таким образом, чтобы вектор переносился в клетку вслед за частицей. Биологически активные частицы (например, высушенная дрожжевая клетка, высушенная бактерия или бактериофаг, каждая(каждый) из которых содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, подлежащих введению) также можно внедрять в растительную ткань.

[0106] В других вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению можно напрямую вводить в геном пластид путем трансформации. Основное преимущество трансформации пластид состоит в том, что пластиды обычно способны экспрессировать бактериальные гены без существенной модификации, и при этом пластиды способны экспрессировать несколько открытых рамок считывания под контролем одного промотора. Технология трансформации пластид подробно описана в патентах США №№ 5451513, 5545817 и 5545818, в заявке согласно PCT № WO 95/16783 и в McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305. Основная методика трансформации хлоропластов предусматривает введение участков клонированной пластидной ДНК, фланкирующих селективируемый маркер, вместе с представляющим интерес геном в подходящую целевую ткань, например, с применением биолистики или трансформации протопласта (например, трансформации, опосредованной хлоридом кальция или PEG). Фланкирующие участки размером 1-1,5 т. о., называемые нацеливающими последовательностями, содействуют гомологичной рекомбинации с геномом пластид и, таким образом, обеспечивают возможность замещения или модификации специфических участков пластома. Сначала в качестве селективируемого маркера трансформации можно использовать точечные мутации в генах 16S rRNA и *gsp12* хлоропластов, придающие устойчивость к спектиномицину или стрептомицину (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530; Staub, J. M., and Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45). Наличие сайтов клонирования между этими маркерами позволяет создать вектор, нацеленный на пластиды, для введения чужеродных генов (Staub, J. M., and Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12, 601-606). Существенного повышения частоты трансформации можно достичь путем замещения рецессивных генов rRNA или r-белка, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, на доминантный селективируемый маркер, бактериальный ген *aadA*, кодирующий фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу, обезвреживающий спектиномицин (Svab, Z., and Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917). Ранее этот маркер успешно применяли для трансформации с высокой частотой

генома пластид зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089). Другие селективируемые маркеры, применимые для трансформации пластид, известны из уровня техники и включены в объем настоящего изобретения. Как правило, для достижения гомопластидного состояния требуется около 15-20 циклов клеточного деления после трансформации. Экспрессия в пластидах, при которой за счет гомологической рекомбинации гены встроены во все несколько тысяч копий кольцевого генома пластид, присутствующих в каждой растительной клетке, использует преимущество огромного числа копий в сравнении с генами, экспрессируемыми в ядре, с обеспечением уровней экспрессии, которые легко могут превышать 10% от общего количества растворимого растительного белка. В одном варианте осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению может быть вставлен в вектор, нацеленный на пластыды, и введен в геном пластид требуемого растения-хозяина путем трансформации. Таким образом, можно получить растения, гомопластические в отношении геномов пластид, содержащих нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, способные экспрессировать полинуклеотид на высоком уровне.

[0107] Способы отбора трансформированных трансгенных растений, растительных клеток или культур растительных тканей являются общепринятыми в уровне техники и могут применяться в способах настоящего изобретения, предусмотренных в данном документе. Например, рекомбинантный вектор по настоящему изобретению также может включать кассету экспрессии, содержащую нуклеотидную последовательность селективируемого маркера, который можно применять для отбора трансформированного растения, части растения или растительной клетки. Применяемое в данном документе выражение “селективируемый маркер” означает нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии придает отличительный фенотип растению, части растения или растительной клетке, экспрессирующим данный маркер, и, таким образом, позволяет отличать такие трансформированные растения, части растений или растительные клетки от тех, которые не имеют маркера. Такая нуклеотидная последовательность может кодировать либо селективируемый, либо подвергаемый скринингу маркер в зависимости от того, придает ли маркер признак, по которому можно провести отбор с помощью химических средств, например путем применения селективного средства (например, антибиотика, гербицида и т. п.), или

от того, является ли маркер просто признаком, который можно идентифицировать посредством наблюдения или тестирования, например путем скрининга (например, признаком, определяемым в R-локусе). Разумеется, много примеров подходящих селективируемых маркеров известны из уровня техники и могут применяться в кассетах экспрессии, описанных в данном документе.

[0108] Примеры селективируемых маркеров включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую *neo* или *nptII*, которые придают устойчивость к канамицину, G418 и т. п. (Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188); нуклеотидную последовательность, кодирующую *bar*, который придает устойчивость к фосфинотрицину; нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSP), которая придает устойчивость к глифосату (Hinchee *et al.* (1988) *Biotech.* 6:915-922); нуклеотидную последовательность, кодирующую нитрилазу, такую как *bxn* от *Klebsiella ozaenae*, которая придает устойчивость к бромоксилилу (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную ацетолататсинтазу (ALS), которая придает устойчивость к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (европейская патентная заявка № 154204); нуклеотидную последовательность, кодирующую устойчивую к метотрексату дигидрофолатредуктазу (DHFR) (Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); нуклеотидную последовательность, кодирующую далапондегалогепазу, которая придает устойчивость к далапону; нуклеотидную последовательность, кодирующую маннозо-6-фосфатизомеразу (также называемую фосфоманнозоизомеразой (PMI)), которая придает способность к метаболизму маннозы (патенты США № 5767378 и № 5994629); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную антранилатсинтазу, которая придает устойчивость к 5-метилтриптофану; или нуклеотидную последовательность, кодирующую *hph*, который придает устойчивость к гигромицину. Специалист в данной области способен выбрать подходящий селективируемый маркер для применения в кассете экспрессии по настоящему изобретению.

[0109] Дополнительные селективируемые маркеры включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую β -глюкуронидазу или *uidA* (GUS), который кодирует фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты; нуклеотидную последовательность R-локуса, которая кодирует продукт, регулирующий продуцирование антоцианиновых пигментов (красного цвета) в

тканях растений (Dellaporta *et al.*, “Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac,” pp. 263-282, в: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); нуклеотидную последовательность, кодирующую β-лактамазу, фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты (например, PADAC, хромогенный цефалоспорин) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); нуклеотидную последовательность, кодирующую *xylE*, который кодирует катехолдиоксигеназу (Zukowsky *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105); нуклеотидную последовательность, кодирующую тирозиназу, фермент, способный окислять тирозин до DOPA и допахинона, который, в свою очередь, конденсируется с образованием меланина (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); нуклеотидную последовательность, кодирующую β-галактозидазу, фермент, для которого существуют хромогенные субстраты; нуклеотидную последовательность, кодирующую люциферазу (*lux*), которая обеспечивает выявление с помощью биолюминесценции (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-859); нуклеотидную последовательность, кодирующую экворин, который может быть использован в обнаружении чувствительной к кальцию биолюминесценции (Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:1259-1268); или нуклеотидную последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14:403-406).

Специалист в данной области способен выбрать подходящий селективируемый маркер для применения в кассете экспрессии по настоящему изобретению.

[0110] Дополнительно, как известно из уровня техники, целые трансгенные растения

можно регенерировать из трансформированных растительных клеток, культур растительных тканей или культивируемых протопластов с помощью любой из множества известных методик. Регенерация растений из растительных клеток, культуры растительных тканей или культивируемых протопластов описана, например, в Evans *et al.* (*Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)); и Vasil I. R. (ed.) (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), and Vol. II (1986)).

[0111] Кроме того, описанные выше свойства генов, обеспеченные с помощью методик генной инженерии в трансгенных растениях, частях растения, растительных клетках или семенах по настоящему изобретению, могут передаваться путем полового размножения или вегетативного роста и, следовательно, могут поддерживаться и

передаваться по наследству растениям-потомкам. Как правило, при поддержании и передаче по наследству применяют известные сельскохозяйственные способы, разработанные для соответствия конкретным целям, таким как уборка урожая, посев или возделывание.

5 [0112] Следовательно, полинуклеотид можно вводить в растение, часть растения или растительную клетку с помощью любого из целого ряда способов, известных из уровня техники, как описано выше. Следовательно, не придерживаются какого-либо конкретного способа введения одного или нескольких полинуклеотидов в растение, а наоборот, можно применять любой способ, обеспечивающий временную
10 экспрессию в растительной клетке или стабильную интеграцию одного или нескольких полинуклеотидов в геном растения. Если требуется ввести более одного полинуклеотида, то соответствующие полинуклеотиды можно собрать как части одной молекулы нуклеиновой кислоты или как отдельные молекулы нуклеиновых кислот и можно расположить в пределах одной и той же или различных молекул
15 нуклеиновых кислот. Соответственно, введение полинуклеотидов в представляющую интерес клетку можно осуществлять в ходе одного события трансформации, в ходе отдельных событий трансформации или, например, в растения, в виде части протокола скрещивания.

[0113] Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают
20 собранные продукты, полученные из трансгенных растений или их частей по настоящему изобретению, а также переработанный продукт, полученный из данных собранных продуктов. Собранный продукт может представлять собой целое растение или любую часть растения, как раскрыто в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления неограничивающие примеры
25 собранного продукта включают семя, плод, цветок или его часть (например, пыльник, рыльце и т. п.), лист, стебель и т. п. В других вариантах осуществления переработанный продукт включает без ограничения муку тонкого помола, муку грубого помола, масло, крахмал, крупу и т. п., полученные из собранного семени или другой части растения по настоящему изобретению, при этом указанное семя
30 или другая часть растения содержат молекулу нуклеиновой кислоты/полинуклеотид/нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению.

[0114] В других вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен экстракт из трансгенного семени или трансгенного растения по настоящему

изобретению, при этом экстракт содержит молекулу нуклеиновой кислоты, полинуклеотид, нуклеотидную последовательность или инсектицидный белок по настоящему изобретению. Экстракты из растений или частей растений можно получить согласно процедурам, хорошо известным в уровне техники (см. de la Torre et al., *Food, Agric. Environ.* 2(1):84-89 (2004); Guidet, *Nucleic Acids Res.* 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton et al., *Food Agric. Immun.* 12:153-164 (2000)).

Оценка активности промотора

[0115] Для оценки активности промотора доступно несколько способов. Конструируют кассеты экспрессии с видимым маркером, как описано выше. Для оценки активности промотора можно применять способы транзientной трансформации. С применением способов трансформации, таких как бомбардировка микрочастицами, опосредованная *Agrobacterium* трансформация или трансформация протопластов, кассеты экспрессии доставляют в растительные клетки или ткани. Активность репортерного гена, например активность β -глюкуронидазы, активность люциферазы или флуоресценцию GFP, отслеживают после трансформации с течением времени, например через 2 часа, 5 часов, 8 часов, 16 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов и 72 часа после доставки ДНК с применением способов, известных в уровне техники. Активность репортерного гена можно отслеживать по ферментативной активности, окрашивая клетки или ткани субстратом для фермента, кодируемого репортерным геном, или путем прямой визуализации при соответствующей длине волны света. Инсектицидный белок, например Cry1Ab или Vip3, по настоящему изобретению, может действовать как видимый маркер, с помощью которого трансформированные растительные клетки исследуют в отношении инсектицидной активности. Можно анализировать полноразмерные промоторные последовательности, делеции и мутации промоторной последовательности и сравнивать уровни их экспрессии. Кроме того, можно измерять уровни РНК с использованием способов, хорошо известных в уровне техники, например, Нозерн-блоттинг, конкурентная ПЦР с обратной транскриптазой и анализы защиты от РНКазы. Посредством таких анализов измеряют уровень экспрессии промотора путем измерения концентрации 'стационарного состояния' стандартной транскрибируемой репортерной mRNA. Это измерение является косвенным, поскольку концентрация репортерной mRNA зависит не только от скорости ее синтеза, но и от скорости, с которой mRNA расщепляется. Следовательно, уровень в стационарном состоянии является

произведением скоростей синтеза и скоростей расщепления. Однако можно считать, что скорость расщепления протекает с фиксированной скоростью, когда транскрибируемые последовательности идентичны, и, таким образом, это значение может служить мерами скорости синтеза.

- 5 **[0116]** Дальнейшее подтверждение активности промотора получают путем стабильной трансформации промотора в кассете экспрессии, содержащей видимый маркер или представляющий интерес ген, в растение, как описано выше. С применением различных способов, описанных выше, например, анализы ферментативной активности, анализ РНК и анализы белков, как описано выше, 10 отслеживают активность промотора в ходе развития и, кроме того, путем мониторинга экспрессии в различных тканях в первичных трансформантах и в последующих поколениях трансгенных растений.

ПРИМЕРЫ

- 15 **[0117]** Настоящее изобретение далее будет описано посредством ссылки на следующие подробные примеры. Эти примеры предоставлены только для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Применяемые в данном документе стандартные методики с использованием рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования хорошо известны в уровне техники и описаны 20 Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d Ed.*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); и T.J. Silhavy, M.L. Berman, and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

25

Пример 1. Идентификация регуляторных элементов маиса.

- [0118]** Регуляторные элементы идентифицировали на запатентованном Syngenta (Zm80K) чипе Affymetrix из генов маиса, которые высоко экспрессируются во многих типах тканей, за исключением тканей пыльцы, т. е. экспрессия в пыльце 30 была очень низкой или не поддавалась обнаружению. Регуляторные элементы из восьми различных генов маиса применяли для создания конструкций для управления экспрессией генов контроля насекомых в трансгенных тканях и

растениях кукурузы. Описание используемых регуляторных элементов приведено в таблице 1.

Таблица 1. Описание регуляторных элементов, используемых для создания экспрессионных конструкций.

Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Описание
PMP370-3	1	Промотор из гена Zm032370 (идентификатор чипа Syngenta), идентифицированный как профилиноподобный. Включает 5'-UTR, первый экзон и интрон, а также часть второго экзона.
PMP393-1	2	Промотор из гена Zm061393 (идентификатор чипа Syngenta), идентифицированный как сахарозосинтаза. Включает 5'-UTR, первый и второй экзоны, а также первый и второй интроны. Также включает мутацию Т в А для удаления стартового кодона.
PMP393-2	3	prZm061393 с энхансером TMV, добавленным на 3'-конце.
PMP393-3	4	prZm061393-02 с мутацией Т в А в точке 8 п. о. для удаления открытой рамки считывания (ORF)
PMP393-4	5	prZm041393-01 с мутацией Т в А в точке 29 п. о. для удаления непреднамеренной кросс-компонентной ORF на антисмысловой цепи.
PMP855-1	6	Промотор из гена ZmU45855-3 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 5'-UTR, первый экзон и первый интрон, а также часть второго экзона.
PMP747-1	7	Промотор из гена Zm001747 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays, идентифицированный как кодирующий белок теплового шока (HSP). Включает 5'-UTR.
PMP004-1	8	Промотор из гена Zm021004 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays, имеющий сходство с генами, кодирующими gap-связывающие белки, и включает 5'-нетранслируемый участок, первый экзон, первый интрон, часть второго экзона и заканчивается оптимизированной для маиса последовательностью Козак.
PMP335-1	9	Промотор из гена Zm015335 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays сходен с генами, кодирующими 40S рибосомные белки, и включает 5'-нетранслируемый участок, первый экзон, первый интрон, частичный второй экзон и заканчивается оптимизированной для маиса последовательностью Козак.
PMP722-1	10	Промотор из гена Zm009722 Zea mays включает

Регуляторный элемент	SEQ ID NO:	Описание
		5'-нетранслируемый участок, первый экзон, первый интрон и часть второго экзона и заканчивается оптимизированной для маиса последовательностью Козак.
PMP948-2	11	Промотор из гена Zm058948 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 5'-нетранслируемый участок, первый экзон, первый интрон, частичный второй экзон и заканчивается оптимизированной для маиса последовательностью Козак.

[0119] Терминаторные элементы были также идентифицированы из тех же генов, из которых были клонированы вышеупомянутые промоторы. Описание терминаторных последовательностей приведено в таблице 2.

5 Таблица 2. Описание терминаторных элементов по настоящему изобретению.

Терминаторный элемент	SEQ ID NO:	Описание
t370-2	12	3'-регуляторная последовательность из гена AF032370 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t393-1	13	3'-регуляторная последовательность из гена Zm061393 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t393-2	14	tZm061393-01 с двумя точечными мутациями для удаления непреднамеренной ORFS.
t855-1	15	3'-регуляторная последовательность из гена ZmU45855-3 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t747-1	16	3'-регуляторная последовательность из гена Zm001747 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t004-1	17	3'-регуляторная последовательность из гена Zm021004 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t335-1	18	3'-регуляторная последовательность из гена Zm015335 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t722-1	19	3'-регуляторная последовательность из гена Zm009722 (идентификатор чипа Syngenta) из Zea

Терминаторный элемент	SEQ ID NO:	Описание
		mays. Включает 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.
t948-2	20	3'-регуляторная последовательность из гена Zm058948 (идентификатор чипа Syngenta) из <i>Zea mays</i> . Включает второй интрон, третий экзон, 3'-UTR и нижележащий нетранскрибируемый участок.

Пример 2. Конструкция векторов экспрессии, не относящихся к ткани пыльцы

[0120] Для исследования вышеописанных регуляторных элементов (промоторов и терминаторов) в трансгенных растениях маиса создавали восемь бинарных векторов. Каждый бинарный вектор содержит две кассеты экспрессии.

[0121] Первая кассета экспрессии содержит энхансер транскрипции eFMV/e35S, функционально связанный с исследуемым промотором по настоящему изобретению, который функционально связан с гетерологичной кодирующей последовательностью (*cry1Ab*), кодирующей инсектицидный белок Cry1Ab (патент США № 5625136), который функционально связан с соответствующей терминаторной последовательностью промотора. Например, кассета экспрессии, созданная для исследования промотора prZm061393-01 (SEQ ID NO:2), содержит терминаторную последовательность tZm061393-01 (SEQ ID NO:13).

[0122] Вторая кассета экспрессии, которая была одинаковой для каждого из бинарных векторов, содержит промотор убиквитина маиса (prUbi1-10) (Christensen et al., 1992 РМВ 18: 675), функционально связанный с кодирующей последовательностью фосфоманноизомеразы (PMI; патент США № 5767378), которая функционально связана с терминаторной последовательностью Ubi1 (tUbi1-01). Экспрессия PMI позволяет осуществлять положительную селекцию трансгенных растений на маннозе.

[0123] Обе кассеты экспрессии клонировали в подходящий вектор для трансформации маиса, опосредованной *Agrobacterium*. Сконструированные бинарные векторы перечислены и описаны в таблице 3.

Таблица 3. Бинарные векторы, сконструированные для исследования промоторов, не относящихся к тканям пыльцы, в маисе.

Бинарный вектор	SEQ ID NO:	Описание
pSYN18499	21	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP370-3 (PMP370-3:cCry1Ab:t370-2)
pSYN18500	22	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP393-1 и t393-1.
pSYN18501	23	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP855-1 и t855-1.
pSYN18498	24	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP747-1. (PMP747:cCry1Ab:t747)
pSYN18617	25	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP004-1. (PMP004-1:cCry1Ab: t004-1).
pSYN18618	26	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP335-1. (prZm015335-01:cCry1Ab:t335-1)
pSYN18619	27	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP722-1 (PMP722-1:cCry1Ab:t722-1).
pSYN18705	28	Бинарный вектор с отбором PMI, содержащий cCry1Ab под контролем PMP948-2 (PMP948-2:cCry1Ab:t948-2).

Пример 3. Временная экспрессия Cry1Ab в маисе, управляемая промоторами, не относящимися к ткани пыльцы

[0124] Описанные выше векторы переносили в штамм *Agrobacterium tumefactions*

LBA4404, содержащий хелперную плазмиду (pSBI), с использованием способа замораживания-оттаивания (An et al., Binary vector. B: Gelvin S B, Schilpoot R A (eds), Plant molecular biology manual. Kluwar Academic Publishers, Dordrecht, pp A3 1-19 (1988)). Подготовку культур *Agrobacterium* проводили, как описано в Azhakanandam et al., Plant Mol. Biol. 63: 393-404 (2007). Вкратце, генетически модифицированные агробактерии выращивали в течение ночи в 50 мл среды YP, содержащей 100 мкМ ацетосирингона и 10 мкМ MES (pH 5,6), а затем осаждали центрифугированием при 4000 x g в течение 10 мин. Осадки ресуспендировали в инфекционной среде (соли Мурасиге и Скуга с витаминами, 2% сахарозы, 500 мкМ MES (pH 5,6), 10 мкМ MgSO₄ и 100 мкМ ацетосирингона) до OD₆₀₀=0,5 и затем выдерживали при 28°C в течение 2-3 часов.

[0125] Анализ временной экспрессии *in planta* в проростках маиса выполняли по сути так, как описано в патенте США № 8642839, полностью включенном в настоящее

описание посредством ссылки. Вкратце, семена кукурузы проращивали в тепличных условиях в 2,5-дюймовых горшках, заполненных смесью для проращивания Fafard. Проростки содержали при цикле день/ночь 14/10 с интенсивностью дневного света 2000 мкмоль-м-2с-1, поддерживаемой дополнительным освещением. Температуру поддерживали в пределах 23°C-26°C. Опыт агроинфильтрации проводили преимущественно с первичными и вторичными листьями стадии V2 (Ritchie S. W., Hanway J. J. Benson G. O. (eds): How a Corn Plant Develops: Iowa State Univ Special Report No. 48, July 2005). Для облегчения инфильтрации сеянцы поливали за 1-2 часа до агроинфильтрации, при которой лист остается набухшим, а устьица открытыми. Инфильтрацию отдельных листьев проводили на проростках маиса с использованием корпуса шприца на 5 мл (шприц BD на 5 мл с Luer-Lok.TM. Tip, BD.TM. Franklin Lakes, N.J. 07427, США), прижимая кончик шприца к абаксиальной поверхности листа. Первый и второй видимые листья стадии V2 были инфильтрованы посредством: 1 мл суспензии агробактерий/28 секунд/лист. Инфильтрованные растения переносили и содержали в камере для выращивания при температуре 25°C с циклом день/ночь 16/8 и интенсивностью света 1900 мкмоль-м-2с-1. Ткань растения собирали через 4 дня после инфильтрации для последующего анализа белка Cry1Ab и обнаружения белка PMI с помощью ELISA. Результаты показали, что оба белка были обнаружены во всех восьми группах векторов, что указывает на то, что промоторы по настоящему изобретению способны управлять экспрессией трансгена в клетках кукурузы.

Пример 4. Экспрессия Cry1Ab в стабильно трансформированной кукурузе с использованием промоторов, не относящихся к ткани пыльцы

[0126] Опосредованную *Agrobacterium* трансформацию незрелых зародышей маиса выполняли, главным образом, как описано в Negrotto *et al.*, 2000, Plant Cell Reports 19: 798-803, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Однако они могут быть заменены различными компонентами среды, известными из уровня техники. Вкратце, штамм LBA4404 (pSB1) *Agrobacterium*, содержащий вектор для трансформации растений, описанный выше, выращивали на твердой среде YEP (экстракт дрожжей (5 г/л), пептон (10 г/л), NaCl (5 г/л), 15 г/л агара, pH 6,8) в течение приблизительно 2-4 дней при приблизительно 28°C. Примерно $0,8 \times 10^9$ *Agrobacterium* суспендировали в среде LS-inf с добавлением 100

мкМ As (Negrotto *et al.*, *выше*). Бактерии предварительно индуцировали в этой среде в течение приблизительно 30-60 минут.

[0127] Незрелые зародыши из подходящего генотипа вырезали из приблизительно 8 – 12 дневных початков в жидкую среду для инфицирования LS + 100 мкМ As.

Зародыши однократно ополаскивали свежей средой для инфицирования. Затем добавляли раствор *Agrobacterium*, и зародыши перемешивали вихревой мешалкой в течение приблизительно 30 секунд, давая при этом им возможность осесть с бактериями в течение приблизительно 5 минут. Затем зародышей переносили стороной со щитком зародыша вверх на среду LSAs и культивировали в темноте в течение двух-трех дней. Впоследствии 20-25 зародышей на чашку Петри переносили на среду LSDc с добавлением цефотаксима (250 мг/л) и нитрата серебра (1,6 мг/л) и культивировали в темноте при 28°C в течение 10 дней.

[0128] Незрелых зародышей, образующих эмбриогенный каллюс, переносили в среду LSD1M0.5S. Примерно в течение 6 недель культуры отбирали на этой среде с этапом пересеивания приблизительно через 3 недели. Выжившие каллюсы переносили на среду Reg1, дополненную маннозой. После культивирования на свету (в режиме 16 часов света/8 часов темноты) зеленые ткани далее переносили на среду Reg2 без регуляторов роста и инкубировали в течение приблизительно 1-2 недель. Проростки переносили в контейнеры Magenta GA-7 (Magenta Corp, Чикаго, штат Иллинойс, США), содержащие среду Reg3, и выращивали на свету. Приблизительно через 2-3 недели растения исследовали на наличие гена *pti* и кодирующей последовательности *cry1Ab-09*. Положительные по результатам ПЦР растения переносили в теплицу и исследовали в отношении уровня экспрессии белка Cry1Ab-09 в листьях и пыльце, а также исследовали в отношении активности против мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*).

[0129] Концентрации белка Cry1Ab определяли на вегетативной (V) и репродуктивной (R) стадиях роста трансгенных растений кукурузы. Стадии “V” обозначают численно как V1, V2, V3 и т. д. по количеству листьев через стадию VT, где видна последняя ветвь метелки. Стадии “R” обозначают как R1-R6 от опущения початка до физиологической зрелости початка соответственно. Cry1Ab количественно определяли с помощью ELISA в листьях на стадиях V3-V4 и VT, а также в рыльце, шелухе и пыльце из 8-12 объектов для каждого промотора, исследуемых с использованием протоколов ELISA, известных в уровне техники. Вкратце, ткань листа лиофилизировали, а затем измельчали до мелкого порошка путем обработки с

использованием кофемолки, блендера, кофемолки Grindomix™ (Brinkmann Instruments; Вестбери, штат Нью-Йорк, США), ступки с пестиком или мельницы или комбинации этих устройств. Всю обработку проводили в присутствии либо сухого льда, либо жидкого азота. Образцы хорошо перемешивали для обеспечения однородности. Определяли процент сухой массы каждого образца, и обработанные образцы хранили при температуре приблизительно -80°C до лиофилизации.

[0130] Для каждого анализируемого образца аликвоту 1,0 г порошкообразного растительного материала (кроме пыльцы) отвешивали в 15-мл полипропиленовую пробирку, суспендировали в 3 мл буфера для экстракции [50 mM CAPS, 0,1 M NaCl, 2 mM ЭДТА, 1 mM дитиотреитола, 1 mM 4-(1-аминоэтил)бензолсульфонилфторида HCl, 1 mM лейпептина, pH 10] и экстрагировали с использованием гомогенизатора Autogizer® (Tomtek; Hamden, Conn., США). После центрифугирования в течение 15 мин. при 10 000 x g при 4°C супернатант использовали для анализа Cry1Ab и PMI с помощью ELISA. После обработки йодацетамидом, как описано Hill и Straka (1988), общий белок в экстрактах определяли количественно с использованием реагента для анализа белка BCA™ (Pierce; Рокфорд, штат Иллинойс, США).

[0131] Экстракты пыльцы кукурузы получали путем суспендирования пыльцы 1:30 (масса/объем) в экстракционном буфере. Приблизительно через 30 минут на льду суспензии пыльцы разрушали тремя пассажами с применением пресса Френча при давлении приблизительно 15000 фунтов/кв. дюйм с последующим центрифугированием при 14 000 x g в течение приблизительно 5 минут при 4°C. Анализы Cry1Ab и PMI с помощью ELISA проводили на супернатантах, как описано ниже. Общий белок определяли количественно, как описано выше.

[0132] Экстракты, полученные, как описано выше, количественно анализировали в отношении Cry1Ab и PMI с помощью ELISA (Tijssen, 1985). Cry1Ab количественно определяли с применением иммуноаффинно очищенного моноклонального антитела к Cry1Ab и иммуноаффинно очищенного поликлонального антитела к Cry1Ab. PMI количественно определяли с применением очищенных посредством белка А поликлональных кроличьих и иммуноаффинно очищенных поликлональных козьих антител, специфичных к PMI. Нижний предел количественного определения двойного сэндвич-варианта ELISA для Cry1Ab и PMI оценивали на основе самой низкой концентрации чистого эталонного белка, лежащей на линейной части стандартной кривой, максимального объема

контрольного экстракта, который можно было проанализировать без фоновых помех, и соответствующего веса образца, представленного аликвотой.

[0133] Результаты ELISA для Cry1Ab показаны в таблице 4. Уровень обнаружения (LOD) в тесте ELISA в отношении Cry1Ab определяли как приблизительно 0,37 нг/мг общего растворимого белка (TSP). Поддающиеся количественному определению уровни белка Cry1Ab обнаруживались в листьях V3-V4, рыльцах, шелухе и листьях VT всех объектов для каждого из исследованных промоторов, которые были значительно выше, чем в пыльце. Концентрация Cry1Ab в пыльце для каждого из промоторов лишь немного превышала LOD для ELISA. Пять из восьми исследованных промоторов в тканях, отличных от тканей пыльцы, экспрессировали уровни Cry1Ab, которые более чем в 1000 раз превышали LOD. Три из восьми промоторов экспрессировали Cry1Ab на уровнях, которые приблизительно в 500-950 раз превышали LOD. Для сравнения, семь из восьми исследованных промоторов экспрессировали Cry1Ab в пыльце на уровнях, которые были менее чем в 10 раз выше, чем LOD, а один промотор, prZmU45855, экспрессировал Cry1Ab в пыльце в концентрации, которая в 15 раз превышала LOD. Однако некоторые растения для каждого объекта каждой из групп векторов, содержащих промотор 001747-01, 061393-01, AF032370-02, 009722-01, 015335-01 или 058948-02, не характеризовались наличием обнаруживаемых уровней Cry1Ab в пыльце. Cry1Ab экспрессировался на уровнях, соответствующих инсектицидным, во всех исследованных тканях, не являющихся тканями пыльцы, тогда как уровни Cry1Ab в пыльце для всех исследованных промоторов были ниже концентрации, необходимой для обеспечения инсектицидной активности.

Таблица 4. Экспрессия Cry1Ab в тканях трансгенных растений кукурузы.

Вектор	Промотор	Среднее значение уровня Cry1Ab (нг/мг TSP)				
		Лист V3-V4	Рыльце	Шелуха	Лист VT	Пыльца
pSYN18499	PMP370-2	389	485	290	229	1,6
pSYN18500	PMP393-1	927	359	437	402	2,2
pSYN18501	PMP855-1	910	461	238	693	5,7
pSYN18498	PMP747-1	324	491	505	341	1,1
pSYN18617	PMP004-1	1037	194	960	462	2,7
pSYN18618	PMP335-1	254	109	243	256	0,3
pSYN18619	PMP722-1	1132	283	390	476	1,3
pSYN18705	PMP948-2	292	215	409	318	1,7

Пример 5. Экспрессия Cry1Ai в стабильно трансформированном маисе

[0134] Растения маиса трансформировали, как описано выше, посредством кассеты экспрессии, содержащей энхансер транскрипции eFMV/e35S, функционально связанный с промотором PMP393-4 по настоящему изобретению (SEQ ID NO:5), функционально связанный с гетерологичной кодирующей последовательностью, которая кодирует полноразмерный инсектицидный белок Cry1Ai (публикация заявки США № 20190177377), который функционально связан с терминатором t393-2 по настоящему изобретению (SEQ ID NO:14). Ткань листа V3-V4 и пыльцу из 40 объектов анализировали, как описано выше. Уровень обнаружения (LOD) в тесте ELISA в отношении Cry1Ai определяли как приблизительно 0,75 нг/мг общего растворимого белка (TSP). Результаты ELISA в отношении тканей из 40 образцов трансгенной кукурузы показали, что уровень белка Cry1Ai в листьях V3-V4 колебался от приблизительно 10 нг/мг TSP до приблизительно 80 нг/мг TSP, тогда как в пыльце белок Cry1Ai не обнаруживался, что указывает на то, что уровень экспрессии в пыльце был ниже LOD ELISA, т. е. <0,75 нг/мг TSP, во всех 40 объектах.

[0135] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, являются показателем уровня компетентности специалистов в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в данный документ посредством ссылки в такой же мере, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно включена посредством ссылки.

[0136] Хотя в целях ясности понимания вышеприведенное изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера, специалистам в данной области будет очевидно, что в рамках объема настоящего изобретения могут быть осуществлены некоторые изменения и модификации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кассета экспрессии, содержащая промотор, содержащий любую из SEQ ID NO:1-11, функционально связанный с представляющим интерес гетерологичным полинуклеотидом, который функционально связан с 3'-нетранслируемым участком, предусматривающим сигнал полиаденилирования, где гетерологичный полинуклеотид функционально транскрибируется в ткани трансгенного растения, не являющейся тканью пыльца.
2. Кассета экспрессии по п. 1, где гетерологичный полинуклеотид кодирует инсектицидный белок или двухцепочечную РНК (dsRNA).
3. Кассета экспрессии по п. 2, где инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3.
4. Кассета экспрессии по п. 3, где белок Cry представляет собой белок Cry1.
5. Кассета экспрессии по п. 4, где белок Cry1 представляет собой белок Cry1A.
6. Кассета экспрессии по п. 5, где белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai.
7. Кассета экспрессии по п. 3, где белок Vip3 представляет собой белок Vip3A.
8. Кассета экспрессии по п. 7, где белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa.
9. Кассета экспрессии по п. 8, где белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa20.
10. Кассета экспрессии по п. 1, где трансгенное растение представляет собой однодольное растение.
11. Кассета экспрессии по п. 10, где однодольное растение представляет собой растение маиса.

12. Кассета экспрессии по п. 11, где растение маиса представляет собой инбредное растение маиса или гибридное растение маиса.
- 5 13. Кассета экспрессии по п. 11, где ткань представляет собой ткань листа, рыльца или шелухи.
14. Рекомбинантный вектор, содержащий кассету экспрессии по п. 1.
- 10 15. Растительная клетка, содержащая кассету экспрессии по п. 1.
16. Растительная клетка по п. 15, где указанная кассета экспрессии стабильно интегрирована в геном растительной клетки.
- 15 17. Растительная клетка по п. 16, где растительная клетка происходит из однодольного растения.
18. Растительная клетка по п. 17, где однодольным растением является маис.
- 20 19. Трансгенное растение, содержащее кассету экспрессии по п. 1.
20. Трансгенное растение по п. 19, где кассета экспрессии стабильно интегрирована в геном растения.
- 25 21. Трансгенное растение по п. 20, где указанное растение представляет собой однодольное растение.
22. Трансгенное растение по п. 21, где однодольным растением является маис.
- 30 23. Трансгенное растение кукурузы по п. 22, где растение маиса представляет собой инбредное растение маиса или гибридное растение маиса.
24. Трансгенное растение маиса по п. 22, где ткань представляет собой ткань листа, рыльца или шелухи.

25. Трансгенное семя растения по п. 19, где семя содержит кассету экспрессии.
26. Трансгенное растение по п. 19, где гетерологичный полинуклеотид кодирует инсектицидный белок.
27. Трансгенное растение по п. 26, где инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3.
28. Трансгенное растение по п. 27, где белок Cry представляет собой белок Cry1.
29. Трансгенное растение по п. 28, где белок Cry1 представляет собой белок Cry1A.
30. Трансгенное растение по п. 29, где белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai.
31. Трансгенное растение по п. 27, где белок Vip3 представляет собой белок Vip3A.
32. Трансгенное растение по п. 31, где белок Vip3A представляет собой белок Viip3Aa.
33. Трансгенное растение по п. 32, где белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa20.
34. Способ экспрессии представляющего интерес белка или полинуклеотида в растении или растительной клетке, включающий введение в растение или растительную клетку кассеты экспрессии, содержащей промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом, который кодирует представляющий интерес белок или полинуклеотид, где указанный промотор содержит любую из SEQ ID NO:1-11, и где указанный представляющий интерес белок или полинуклеотид функционально экспрессируется в ткани трансгенного растения, которая не является тканью пыльцы.

35. Способ по п. 34, где представляющий интерес белок представляет собой инсектицидный белок, или представляющий интерес полинуклеотид представляет собой dsRNA, которая характеризуется инсектицидной активностью.
- 5 36. Способ по п. 35, где инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3.
37. Способ по п. 36, где белок Cry представляет собой белок Cry1.
- 10 38. Способ по п. 37, где белок Cry1 представляет собой белок Cry1A.
39. Способ по п. 38, где белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai.
40. Способ по п. 39, где белок Vip3 представляет собой белок Vip3A.
- 15 41. Способ по п. 40, где белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa.
42. Способ по п. 41, где белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa20.
- 20 43. Способ по п. 34, где трансгенное растение представляет собой растение маиса.
44. Способ по п. 43, где ткань представляет собой ткань листа, шелухи или рыльца.
45. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: а) последовательности, представленной под любой из SEQ ID NO:1-11; б) нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью а); и с) нуклеотидной последовательности, содержащей фрагмент нуклеотидной последовательности а), где указанный фрагмент сохраняет функцию нуклеотидной последовательности а), где указанная молекула нуклеиновой кислоты инициирует функциональную транскрипцию представляющего интерес функционально связанного полинуклеотида в ткани трансгенного растения, которая не является тканью пыльника.
- 25
- 30

46. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где представляющий интерес функционально связанный полинуклеотид кодирует инсектицидный белок или dsRNA.
- 5 47. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 46, где инсектицидный белок представляет собой белок Cry или белок Vip3.
48. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 47, где белок Cry представляет собой белок Cry1.
- 10 49. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 48, где белок Cry1 представляет собой белок Cry1A.
50. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 49, где белок Cry1A представляет собой белок Cry1Ab или Cry1Ai.
- 15 51. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 48, где белок Vip3 представляет собой белок Vip3A.
- 20 52. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 51, где белок Vip3A представляет собой белок Vip3Aa.
53. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 52, где белок Vip3Aa представляет собой белок Vip3Aa20.
- 25 54. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1.
55. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2.
- 30 56. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3.

57. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4.
58. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор
5 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 5.
59. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 6.
- 10 60. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 7.
61. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 8.
15
62. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 9.
63. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор
20 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 10.
64. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанный промотор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11.
- 25 65. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 45, где указанное трансгенное растение представляет собой трансгенное растение маиса.
66. Кассета экспрессии по п. 1, где 3'-нетранслируемый участок содержит
терминаторную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 12-20.
30
67. Рекомбинантный вектор по п. 14, где указанный вектор представляет собой бинарный вектор, содержащий любую из SEQ ID NO: 21-28.

68. Способ специфической экспрессии гетерологичной кодирующей последовательности в трансгенной ткани растения, не являющейся тканью пыльцы, включающий: а) трансформацию растительных клеток вектором, где указанный вектор содержит кассету экспрессии по п. 1; б) выращивание трансгенных растительных
5 клеток, содержащих указанную кассету экспрессии; и в) получение трансгенных растений из указанных трансформированных растительных клеток, где гетерологичная кодирующая последовательность специфически экспрессируется в ткани, не являющейся тканью пыльцы, под контролем указанной молекулы нуклеиновой кислоты.