

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 022829

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2016.03.31

(51) Int. Cl. C12N 15/29 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)

(21) Номер заявки  
200870576

(22) Дата подачи заявки  
2007.05.24

(54) ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ ИЛИ ЕГО ЧАСТЬ, ОБЛАДАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ  
К НАСЕКОМЫМ ОТРЯДА LEPIDOPTERA

(31) 60/808,834

(56) Marta Hernandez, et al. "A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize yieldgard based on the 3'-transgenic integration sequence.", Transgenic Res, Vol.12(2): 179-189 (Apr. 2003). See the whole document

(32) 2006.05.26

Herman R.A., et al. "Compositional equivalency of Cry 1F corn event TC6275 and conventional corn (Zea may L.)." J. Agric. Food Chem., Vol 52(9): 2726-2734 (05 May 2004) See the whole document

(33) US

US-B2-6868634

(43) 2009.04.28

US-A1-20040172671

(86) PCT/US2007/069662

(87) WO 2007/140256 2007.12.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС  
(US)

(72) Изобретатель:

Андерсон Хитер, Дуглас Дженинфер,  
Гроат Джинна, Джонсон Скотт, Келли  
Ребекка, Корт Джон, Райс Джеймс  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к растению кукурузы или его части, обладающим устойчивостью к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, клетке растения кукурузы, обладающей устойчивостью к заражению насекомыми паразитами Lepidoptera, продукту, полученному из упомянутого растения кукурузы, способу получения устойчивого к насекомым растения кукурузы, способу защиты растения кукурузы от заражения насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, паре молекул ДНК, способу обнаружения в биологическом образце растения кукурузы ДНК растения кукурузы, набору для обнаружения ДНК, способу определения в биологическом образце зиготности ДНК растения кукурузы, ДНК-праймеру.

B1

022829

022829  
B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 60/808834, поданной 26 мая 2006 г.

### Область техники

Изобретение относится к случаю трансгенной кукурузы MON89034 и частям растения и его семени. Этот случай проявляет устойчивость к заражению насекомыми отряда Lepidoptera. Настоящее изобретение также относится к способам применения растений и семян, содержащих ДНК, которая является диагностической в отношении присутствия трансгенного случая при зондировании на присутствие уникальных нуклеотидных последовательностей трансгенного случая, и способам обнаружения присутствия указанного случая кукурузы в биологическом образце по обнаружению специфических нуклеотидных последовательностей, уникальных для трансгенного случая. Настоящим изобретением предоставляются уникальные нуклеотидные последовательности этого случая.

### Предпосылки создания изобретения

Изобретение относится к устойчивому к отряду Lepidoptera (чешуекрылым) трансгенному сорту растений кукурузы (*Zea mays*), упоминаемому в настоящем описании как случай MON89034, и присутствующей уникальной последовательности ДНК, которая при обнаружении в любом образце или сорте кукурузы является диагностической в отношении присутствия случая трансгенного растения кукурузы MON89034 в образце или сорте и также относится к обнаружению области трансгена/геномной вставки в кукурузе MON89034 и растениям потомства и семенам, происходящим из них.

Случай растения кукурузы MON89034, в частности, устойчив к насекомым отряда Lepidoptera, таким как осенний походный червь (*Spodoptera frugiperda*), кукурузный мотылек (*Ostrinia nubilalis*), хлопковая совка (*Helicoverpa zea*), юго-западная кукурузная огневка (*Diatraea grandiosella*) и совка иpsilon (*Agrotis epsilon*) и т.п., все из которых являются агрономически важными насекомыми-вредителями.

Кукуруза является важной сельскохозяйственной культурой и основным пищевым источником во многих областях мира. Способы биотехнологии использовали для кукурузы с целью улучшения агрономических признаков и качества продукта. Одним из таких агрономических признаков является устойчивость к насекомым, например генетически созданная устойчивость к видам чешуекрылых и жесткокрылых, которая возникает в растениях кукурузы, генетически созданных так, что они содержат один или несколько генов, кодирующих инсектицидные агенты (см., например, патент США № 6489542 и патент США № 6620988). Полезно обнаружение присутствия конкретного трансгенного случая в биологическом образце для определения того, содержит ли одно или несколько потомств от полового скрещивания трансгенный материал. Например, обнаружение случая в образце является важным для целей лицензирования, для установления и поддержания стандартов степени чистоты, важным для подчинения регуляторным органам, для соответствия стандартам для пищевых ингредиентов, для применения в судопроизводстве для установления того, что один или несколько конкретных индивидуумов или организаций использовали конкретный случай без лицензии от обладателя или лицензиата любых патентов, направленных на трансгенный случай, и для гарантии соответствия различным постановлениям правительства и/или законам.

Кроме того, способы, позволяющие обнаружить конкретное растение, были бы полезны при подчинении регламентам, требующим предпродажного разрешения и маркировки продуктов, получаемых из рекомбинантных растений - сельскохозяйственных культур. Индивидуумы или организации, резистентные к присутствию трансгенного случая в образце, также хотят иметь надежные способы обнаружения присутствия трансгена в образце для осуществления ими возможности капитализации своего бизнеса, в котором используется преимущество отсутствия трансгена в их продуктах.

Несмотря на эти преимущества возможно, что насекомые смогут развить сопротивление растениям, экспрессирующими только один δ-эндотоксин *B.thuringiensis*. Такое сопротивление, при его широком распространении, несомненно, ограничит коммерческую ценность зародышевой плазмы, содержащей только гены *Bt*.

Одним возможным способом увеличения эффективности инсектицидных агентов, предоставляемых через трансгенные растения и направленных на контролирование целевых насекомых-вредителей, и одновременного снижения вероятности появления насекомых-вредителей, устойчивых к таким инсектицидным агентам, могло бы быть обеспечение экспрессии трансгенными сельскохозяйственными культурами высоких уровней этих инсектицидных агентов, таких как дельта-эндотоксины *Bacillus thuringiensis* (McGaughey and Whalon (1992), *Science* 258: 1451-55; Roush (1994) *Biocontrol. Sci. Technol.* 4: 501-516). Кроме того, наличие депо инсектицидных генов, которые являются эффективными против групп насекомых-вредителей и проявляют свои действия через различные принципы действия, может защитить против развития устойчивости. Возникновение устойчивости можно было бы в значительной степени отсрочить в результате предоставления сельскохозяйственной культуры, которая экспрессирует две или более инсектицидных активностей, проявляя перекрывающуюся токсичность в отношении одного и того же вида насекомых. Одним из способов достижения таких двойственных принципов действия могло бы быть предоставление растения, экспрессирующего ген *Bt*, токсичный в отношении конкретного вида насекомого, вместе с днРНК, которую предоставляют с целью супрессии существенного гена того же вида

насекомого, на который направлен токсин Bt, при этом днРНК индуцирует реакцию интерференционной РНК при проглатывании целевым вредителем, что предоставляет способы дублирования в случае развития у насекомого устойчивости или к днРНК, или к гену Bt. В альтернативном случае коэкспрессия в растении двух или более инсектицидных токсинов, оба из которых токсичны в отношении одного и того же вида насекомого, но каждый проявляет различный принцип осуществления своей активности по уничтожению, особенно при экспрессии обоих на высоких уровнях, обеспечивает способ эффективного управления устойчивостью. Примеры таких инсектицидов, применимых в таких комбинациях, включают, но без ограничения, токсины Bt, инсектицидные белки видов *Xenorhabdus* или *Photorhabdus*, десенсибилизированные и дегликозилированные белки пататина и/или пермутеины, лектины растений и т.п.

Известно, что на экспрессию чужеродных генов в растениях оказывает влияние их хромосомное месторасположение, возможно вследствие структуры хроматина (например, гетерохроматина) или близости регулирующих транскрипцию элементов (например, энхансеров) к сайту интеграции (Weising et al. (1980 Ann. Rev. Genet 22: 421-477). По этой причине часто необходимо скринировать большое количество случаев для идентификации случая, характеризующегося оптимальной экспрессией представляющего интерес введенного гена. Даже тогда, когда в руках имеются дюжины или даже сотни различных трансгенных случаев, нет уверенности в успешном идентифицировании одного трансгенного случая, который обеспечивает оптимальные уровни экспрессии по крайней мере двух различных токсинов или инсектицидных агентов и не имеет каких-либо нежелательных агрономических недостатков или фитотоксических эффектов, или в результате вставки в некоторую существенную или отчасти существенную область генома растения, или в результате токсических эффектов, вызванных уровнями экспрессии трансгенов. Например, в растениях и в других организмах наблюдали, что среди случаев может быть широкая вариация уровней экспрессии введенного гена. Также могут быть различия в пространственных или временных характеристиках экспрессии, например, различия в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растения, которые могут не соответствовать характеристикам, ожидаемым на основе регулирующих транскрипцию элементов, присутствующих в конструкции вводимого гена. По этой причине обычно получают от нескольких сотен до нескольких тысяч различных случаев и скринируют случаи в отношении одного случая, который обладает желаемыми для коммерческих целей уровнями и характеристиками экспрессии трансгена. Случай, который обладает желаемыми уровнями или характеристиками экспрессии трансгена, применим для интроверсии трансгена в другую генетическую среду с помощью полового ауткрессинга, используя общепринятые способы скрещивания. Потомство от таких скрещиваний сохраняет характеристики экспрессии трансгена исходного трансформанта. Этую стратегию используют для обеспечения надежной экспрессии гена в ряде сортов, которые подходящим образом адаптированы к специфическим локальным условиям роста.

Можно обнаружить присутствие трансгена с помощью любого хорошо известного способа обнаружения нуклеиновой кислоты, такого как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или гибридизация ДНК, используя зонды в виде нуклеиновых кислот. Эти способы обнаружения, как правило, фокусируются на часто используемых генетических элементах, таких как промоторы, терминаторы, маркерные гены или даже последовательности, кодирующие белок, или представляющие интерес днРНК, экспрессируемые с трансгеном(ов) и т.п. В результате такие способы нельзя использовать для проведения различий между различными случаями, в частности теми случаями, которые были получены с использованием одной и той же ДНК-конструкции, если не известна последовательность хромосомной ДНК, примыкающая к вставленной ДНК ("фланкирующая ДНК"). В зависимости от способа, используемого для введения трансгена(ов) в геном растения, могут наблюдаться аберрантные или необычные эффекты, которые часто существенно осложняют идентификацию последовательностей генома растения, фланкирующих трансгенную ДНК, которая была предназначена для введения в растение. Часто перестройки вставленной ДНК, перестройки фланкирующей геномной ДНК или перестройки и вставленной ДНК, и фланкирующей геномной ДНК преобладают и осложняют анализ оцениваемого случая вставки. Поэтому полезно иметь способ отбора, идентификации и гарантии чистоты и характеристик конкретного трансгенного случая в образце, и единственным способом выполнения этого является идентификация одной или нескольких уникальных последовательностей, связанных только с желаемым трансгенным случаем, и присутствие таких последовательностей в биологическом образце, содержащем ДНК вида растения, в который вставлена трансгенная ДНК для создания этого случая, диагностирует, таким образом, этот случай в таком образце.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к растению кукурузы или его части, обладающему устойчивостью к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, содержащему нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

Настоящее изобретение также относится к клетке растения кукурузы, обладающей устойчивостью к заражению насекомыми паразитами Lepidoptera, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5, и продукту, полученному из упомянутого растения кукурузы, в частности выбранному из группы, состоящей из кукурузного толокна, кукурузного масла, кукурузной лепешки, кукурузного семени, кукурузных ростков, кукурузного крахмала, кукурузной муки, кукурузной пыльцы, кукурузного шелка, жид-

кого кукурузного экстракта, кукурузного солода, кукурузного сахара, кукурузного сиропа, маргарина, получаемого из кукурузного масла, сухих продовольственных товаров из барды (DDGS).

Объектом настоящего изобретения является способ получения устойчивого к насекомым растения кукурузы, включающий: (а) скрещивание растения кукурузы по любому из пп.1, 2 с другим растением кукурузы; (б) получение потомства растения от указанного скрещивания (а); и (с) отбор потомства, которое содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, причем указанное отобранное потомство является устойчивым к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera.

Другим объектом настоящего изобретения является способ получения устойчивого к насекомым паразитам отряда Lepidoptera растения кукурузы, включающий (а)трансформацию клетки растения кукурузы нуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO:5; и (б)регенерацию растения кукурузы из указанной трансформированной клетки, причем указанное растение кукурузы содержит указанную нуклеотидную последовательность и является устойчивым к насекомым паразитам отряда Lepidoptera.

Еще одним объектом настоящего изобретения является способ защиты растения кукурузы от заражения насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, включающий введение в пищевой рацион вредителя кукурузы отряда Lepidoptera инсектицидно эффективного количества клеток(и) или тканей(и) трансгенного растения кукурузы, или его частей, по любому из пп.1, 2.

Настоящее изобретение также относится к паре молекул ДНК, содержащей первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем молекулы ДНК содержат по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов SEQ ID NO:5, или SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:4, или комплементарную им последовательность для функционирования в качестве ДНК-праймеров или зондов, диагностических в отношении ДНК, экспрессированной из растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, или его потомства.

Другим объектом настоящего изобретения является способ обнаружения в биологическом образце растения кукурузы ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий:(а) приведение в контакт указанного биологического образца с парой молекул ДНК, раскрытой в любом из пп.11-18; (б) обеспечение условий для реакции амплификации нуклеиновой кислоты; (с)проведение указанной реакции амплификации с получением молекулы ДНК-ампликона, причем обнаружение ампликона, содержащего по крайней мере одну из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или комплементарной им последовательности, указывает на наличие искомой молекулы ДНК в указанном биологическом образце.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ обнаружения в биологическом образце растения кукурузы ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий: (а) приведение в контакт указанного биологического образца с ДНК-зондом, который содержит SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или комплементарную им последовательность и гибридизуется в жестких условиях с одной или несколькими нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, или комплементарным им последовательностям; (б) обеспечение жестких условий гибридизации для указанного биологического образца и ДНК-зонда, причем обнаружение гибридизации указывает на наличие искомой молекулы ДНК в биологическом образце.

Настоящее изобретение также относится к набору для обнаружения ДНК, представленной последовательностью SEQ ID NO:5, содержащему по крайней мере две ДНК-молекулы, содержащие по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов последовательностей SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:5, или последовательностей, комплементарных указанным для функционирования в качестве ДНК-праймера или зонда, специфического для растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, и/или его потомства.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ определения в биологическом образце зиготности ДНК растения кукурузы, содержащего SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий: (а) приведение в контакт указанного образца с набором праймеров, содержащих SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:10, который (1) при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, приводит к образованию первого ампликона, который является диагностическим для растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, и (2) при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей геномную ДНК кукурузы, отличную от ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, приводит к образованию второго ампликона, который является диагностическим для геномной ДНК кукурузы, отличной от ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455; (б) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, причем обнаружение обоих указанных выше ампликонов свидетельствует о том, что образец является гетерозиготным по ДНК растения

кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, а обнаружение только первого из указанных выше ампликонов свидетельствует о том, что указанный образец является гомозиготным по ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455.

Настоящее изобретение также относится к устойчивому к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera растению или его потомству, содержащее последовательность SEQ ID NO:5.

Настоящее изобретение также относится к устойчивому к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera семени растения, содержащее последовательность SEQ ID NO:5.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является ДНК-праймер для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере 30 непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:3 или комплементарной ей последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:1.

Другим аспектом настоящего изобретения является ДНК-праймер для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере 30 непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:4 или комплементарной ей последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:2.

Другим объектом изобретения является набор для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере две молекулы из 30 или более непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:4, или комплементарной им последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

Настоящее изобретение относится к трансгенному растению кукурузы, обозначенному MON89034, и его потомству, которые неотличимы от случая кукурузы MON89034 (до такой степени, что они также содержат по крайней мере одну аллель, которая соответствует вставленной трансгенной ДНК), имеющему семя, которое депонировано 28 марта 2006 г. в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) под номером поступления РТА-7455. Другим аспектом настоящего изобретения являются растения потомства или семена, или регенерируемые части растения и семена случая кукурузы MON89034, которые содержат полинуклеотид, выбираемый из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5. Настоящее изобретение также включает части растения случая кукурузы MON89034, которые включают, но без ограничения, пыльцу, семяпочку, цветы, ростки, корни, стебли, шелк, метелки, колоски и листья, пока эти части содержат по крайней мере полинуклеотиды, определенные выше. Новые генетические составы, содержащиеся в геноме MON89034 и продуктах из MON89034, таких как мука крупного помола, мука, масло, мякоть и биомасса, оставляемая на поле растений кукурузы, соответствующих случаю MON89034, являются аспектом этого изобретения.

Настоящим изобретением предоставляется устойчивое к насекомым растение кукурузы, обладающее всеми физиологическими и морфологическими свойствами случая кукурузы MON89034.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предоставляются композиции и способы для обнаружения присутствия области трансгена/вставки в геном из нового растения кукурузы, обозначенного MON89034. Предоставляются последовательности ДНК, которые включают по крайней мере одну последовательность стыка случая MON89034, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 (расположенной в положениях 2051-2070 в SEQ ID NO:5) и SEQ ID NO:2 (расположенную в положениях 11295-11314) и их комплементов; причем последовательность стыка охватывает стык между гетерологичной ДНК, вставленной в геном, и ДНК клетки кукурузы, flankирующей сайт вставки, и диагностирует этот случай (фиг. 1). Случай кукурузы MON89034 и семя, включающие эти молекулы ДНК, являются аспектами этого изобретения.

Последовательности ДНК, которые включают область нового трансгена/вставки в геном, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4 (фиг. 1) из случая кукурузы MON89034, являются аспектами этого изобретения. Растение кукурузы и семя, включающие эти молекулы, являются также аспектами этого изобретения.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предоставляются две молекулы ДНК для применения в способе обнаружения ДНК, причем первая молекула ДНК включает по крайней мере 11 или более непрерывных полинуклеотидов любой части области трансгена молекулы ДНК SEQ ID NO:3, а другая молекула ДНК имеет схожую длину любой части области 5' flankирующей геномной ДНК кукурузы SEQ ID NO:3, причем эти молекулы ДНК при применении вместе пригодны в качестве ДНК-праймеров в способе амплификации ДНК, с помощью которого образуется ампликон. Ампликон, образованный с использованием этих ДНК-праймеры в способе амплификации ДНК, диагностирует случай кукурузы MON89034, когда ампликон содержит SEQ ID NO:1. Любой ампликон, образованный с

помощью ДНК-праймеров, гомологичных или комплементарных любой части SEQ ID NO:3, и любой ампликон, который включает SEQ ID NO:1, является аспектом настоящего изобретения.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предоставляются две молекулы ДНК для применения в способе обнаружения ДНК, причем первая молекула ДНК включает по крайней мере 11 или более непрерывных полинуклеотидов любой части области трансгена молекулы ДНК SEQ ID NO:4, а другая молекула ДНК имеет схожую длину любой части 3' фланкирующей геномной ДНК кукурузы SEQ ID NO:4, причем эти молекулы ДНК пригодны в качестве ДНК-праймеров в способе амплификации ДНК. Ампликон, образованный с использованием этих ДНК-праймеров в способе амплификации ДНК, диагностирует случай кукурузы MON89034, когда ампликон содержит SEQ ID NO:2. Любой ампликон, образованный с помощью ДНК-праймеров, гомологичных или комплементарных любой части SEQ ID NO:4, и любой ампликон, который включает SEQ ID NO:2, является аспектом настоящего изобретения.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предоставляются способы обнаружения присутствия ДНК, соответствующей случаю кукурузы MON89034, в образце. Такие способы включают (а) приведение в контакт образца, включающего ДНК, с набором праймеров, который при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из случая кукурузы MON89034 приводит к образованию ампликона, который является диагностическим в отношении случая кукурузы MON89034; (б) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, образуя тем самым ампликон; и (с) обнаружение ампликона, причем указанный ампликон включает SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

Предоставляется растение кукурузы или семя, или продукт, получаемый из растения или семени MON89034, причем геномная ДНК включает молекулу ДНК, по существу состоящую из SEQ ID NO:5 и ее комплементов. Предоставляется растение кукурузы или семя, или продукт, получаемый из растения или семени MON89034, в которых геномная ДНК, выделенная из растения кукурузы или семени, или продукта, включает молекулу ДНК, включающую нуклеотиды 2061-11305 SEQ ID NO:5, и их комплементы.

Предоставляется растение кукурузы или семя, или продукт, получаемый из растения или семени MON89034, в которых геномная ДНК, выделенная из растения кукурузы или семени, или продукта, приводит к образованию ампликона в способе амплификации ДНК, причем в способе амплификации ДНК используются молекулы ДНК-праймеров SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предоставляются способы обнаружения присутствия ДНК, соответствующей случаю MON89034, в образце, при этом такие способы включают: (а) приведение в контакт образца, включающего ДНК, с зондом, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с геномной ДНК из случая кукурузы MON89034 и не гибридизуется в жестких условиях гибридизации с ДНК контрольного растения кукурузы; (б) подвергание образца и зонда жестким условиям гибридизации; и (с) обнаружение гибридизации зонда с ДНК случая кукурузы MON89034, причем указанный зонд включает SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ определения зиготности потомства случая кукурузы MON89034, включающий: (а) приведение в контакт образца, включающего ДНК кукурузы, с набором праймеров, включающим SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), SQ6523 (SEQ ID NO:10), SQ6524 (SEQ ID NO:11), PB880 (SEQ ID NO:14) и PB2931 (SEQ ID NO:15), который при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из случая кукурузы MON89034 приводит к образованию первого ампликона, который является диагностическим в отношении случая кукурузы MON89034; и (б) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, образуя тем самым первый ампликон; и (с) обнаружение первого ампликона; и (д) приведение в контакт образца, включающего ДНК кукурузы, с указанным набором праймеров, который при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из растений кукурузы приводит к образованию второго ампликона, включающего встречающуюся в природе кукурузную геномную ДНК, гомологичную кукурузной геномной области вставки трансгена, идентифицируемой как случай кукурузы MON89034; и (е) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, образуя тем самым второй ампликон; и (ф) обнаружение второго ампликона; и (г) сравнение первого и второго ампликонов в образце, причем присутствие обоих ампликонов указывает на то, что образец является гетерозиготным по вставке трансгена.

Одним аспектом настоящего изобретения является обеспечение в пище чешуекрылого вредителя инсектицидно эффективного количества случая кукурузы MON89034.

Другим аспектом настоящего изобретения является предоставление композиции или биологического образца в форме продукта или пищевого продукта, получаемого из случая кукурузы MON89034, продукта или пищевого продукта, включающего колоски кукурузы, очищенную от шелухи кукурузы, кукурузный шелк, кукурузную пыльцу, подвергнутую дроблению кукурузу, кукурузную муку крупного помола, размельченную кукурузу, кукурузную муку, кукурузное масло, кукурузный крахмал, жидкий кукурузный экстракт, кукурузный солод, кукурузный сахар, кукурузный сироп, маргарин, получаемый из кукурузного масла, ненасыщенного кукурузного масла, насыщенного кукурузного масла, кукурузные хлопья, попкорн, этанол и/или напиток, полученные из кукурузы или продуктов кукурузы, включающих ДНК, которая является диагностической в отношении случая кукурузы MON89034, сухие продовольст-

венные товары из барды (DDGS), получаемые при ферментации такого случая кукурузы, и корма для животных, включающие такие DDGS и/или кукурузу, независимо от того является она целой, подвергнутой дроблению или измельчению, подвергнутые технологической обработке пищевые продукты, косметическое средство и наполнитель, в которых обнаруживается определяемое количество полинуклеотида, который является диагностическим в отношении присутствия случая трансгенной кукурузы MON89034 в биологическом образце. Альтернативным способом предоставления кукурузы в качестве пищевого продукта является предоставление кукурузы в различных формах зерна для питания, таких как целая кукуруза, подвергнутая дроблению кукуруза, подвергнутая измельчению кукуруза, и различных формах вышеотмеченного в смеси с сорго, почечным салом, просом, подсолнечником, овсом, пшеницей, рисом, бобами и т.п. Определяемые количества в таком продукте или пищевом продукте нуклеотидной последовательности, такой как та, которая определена в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, или их комплементах, диагностируют присутствие ДНК такого трансгенного случая MON89034 в образце, и, следовательно, присутствие клеток трансгенного случая в качестве источника ДНК в образце.

Вышеотмеченные и другие аспекты настоящего изобретения станут более явными из следующего подробного описания.

### Чертежи

На чертеже показана организация вставки трансгена, присутствующей в геноме случая трансгенной кукурузы MON89034. Центральная открытая или белая полоса представляет собой вставленную ДНК. Ниже белой полосы находится схема, представляющая собой различные элементы во вставленной ДНК. Концы вставленной ДНК произвольно обозначены как 5' (с левой стороны фигуры) и 3' (с правой стороны фигуры). Правая краевая и левая краевая последовательности или сегменты отмечены под каждым концом схемы, иллюстрирующей различные элементы во вставленной ДНК. Отмеченными элементами в экспрессионных кассетах в пределах вставленной ДНК являются, в следующем порядке, начиная с правого края: промотор e35S, нетраслируемая лидерная последовательность CAB пшеницы, инtron актина риса, кодирующая Cgt1A.105 последовательность, 3' последовательность терминации и полиаденилирования HSP17 пшеницы, промотор FMV, инtron hsp70, последовательность, кодирующая пептид для переноса в хлоропласт небольшой субъединицы Rubisco, кодирующая Cgt2Ab последовательность, иначе не указанная 3' последовательность терминации и полиаденилирования и затем левый край. Вертикально огороженные полосы с каждого из двух концов центральной открытой или белой полосы соответствуют произвольно обозначенным 5' и 3' фланкирующим последовательностям генома кукурузы. Самая длинная черная линия над огороженными полосами и открытой или белой полосой представляет собой SEQ ID NO:5 (полноразмерную последовательность, представленную на фигуре, отображающую 5' фланкирующую последовательность, последовательность вставленной ДНК и 3' фланкирующую последовательность). Более короткие черные линии выше и ниже черной линии, отмеченной как SEQ ID NO:5, представляют собой приблизительные местоположения в пределах SEQ ID NO:5, в которых можно обнаружить каждую из специально отмеченных последовательностей (т.е. SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4). SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 и любая последовательность, происходящая из случая кукурузы MON89034, содержащая SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, являются диагностическими в отношении присутствия ДНК случая кукурузы MON89034 в биологическом образце.

### Подробное описание изобретения

Следующие определения и способы предоставлены для лучшего определения настоящего изобретения и направления специалистов со средним уровнем компетентности в данной области техники при осуществлении на практике настоящего изобретения. Если не отмечено иное, термины следует понимать в соответствии с общепринятым употреблением специалистами со средним уровнем компетентности в релевантной области техники. Определения общих терминов молекулярной биологии можно также найти у Reiger и др. (Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5<sup>th</sup> edition, Springer-Verlag: New York, 1991) и Lewin (Genes V., Oxford University Press: New York, 1994).

Как здесь используется, термин "кукуруза" означает *Zea mays* или маис и включает все сорта растения, которые можно вывести из кукурузы, в том числе дикие виды кукурузы.

Как здесь используется, термин "включающий" означает "включающий, но без ограничения".

Трансгенный "случай" получают трансформацией клеток растения гетерологичной ДНК, т.е. конструкцией нуклеиновой кислоты, которая включает представляющий интерес трансген, регенерацией популяции растений, являющейся результатом вставки трансгена в геном растения, и отбором конкретного растения, характеризующегося вставкой в конкретное местоположение генома. Термин "случай" относится к первоначальному трансформанту и потомству трансформанта, которые содержат гетерологичную ДНК. Термин "случай" также относится к потомству, получаемому с помощью полового аутокроссинга между трансформантом и другим сортом, которое содержит гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания до возвратного родителя вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя присутствует в потомстве от скрещивания в том же самом местоположении в хромосоме. Термин "случай" также относится к ДНК из первоначального трансформанта, включающей вставленную ДНК и фланкирующую геномную последовательность, непосредственно примыкающую к вставленной ДНК, которая, как следовало бы ожидать, передается потомству, получающему вставлен-

ную ДНК, включающую представляющий интерес трансген, в результате полового скрещивания родительской линии, содержащей вставленную ДНК, (например, первоначального трансформанта и потомства, являющегося результатом самоопыления) и родительской линией, не содержащей вставленной ДНК. Настоящее изобретение относится к ДНК случая MON89034, клеткам растения, тканям, семенам и подвергнутым технологической обработке продуктам, получаемым из MON89034.

Также следует понимать, что два различных трансгенных растения можно также скрестить с получением потомков, которые содержат два независимо добавленных расщеплением, экзогенных гена. При самоопылении соответствующего потомства можно получить растения, гомозиготные по обоим добавленным, экзогенным генам. В качестве вегетативного размножения также предусматриваются обратное скрещивание до родительского растения и ауткрессинг с нетрансгенным растением. Описания других способов скрещивания, обычно используемых для различных признаков и сельскохозяйственных культур, можно найти в одной из нескольких ссылок, например, Fehr, в Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

"Зонд" представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, к которой присоединена традиционная определяемая метка или репортерная молекула, например, радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент. Такой зонд комплементарен цепи нуклеиновой кислоты-мишени, в случае настоящего изобретения цепи геномной ДНК случая кукурузы MON89034 или из растения кукурузы, или из образца, который включает ДНК этого случая. Зонды в соответствии с настоящим изобретением включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также полиамиды и другие зондовые вещества, которые специфически связываются с последовательностью ДНК-мишени и могут использоваться для обнаружения присутствия этой последовательности ДНК-мишени.

"Праймеры" представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты, которые подвергаются отжигу с комплементарной цепью ДНК-мишени с помощью гибридизации нуклеиновых кислот с образованием гибрида между праймером и цепью ДНК-мишени, затем подвергаются удлинению вдоль цепи ДНК-мишени полимеразой, например ДНК-полимеразой. Пара праймеров настоящего изобретения относится к их применению для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, например с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других традиционных способов амплификации нуклеиновой кислоты.

Длина зондов и праймеров составляет, как правило, 11 нуклеотидов или более, предпочтительно 18 нуклеотидов или более, более предпочтительно 24 нуклеотида или более и наиболее предпочтительно 30 нуклеотидов или более. Такие зонды и праймеры специфически гибридизуются с последовательностью-мишени в условиях гибридизации высокой жесткости. Предпочтительно, последовательности зондов и праймеров в соответствии с настоящим изобретением полностью сходны с последовательностью-мишени, хотя с помощью традиционных способов можно создать зонды, которые отличаются от последовательности-мишени и сохраняют способность гибридизоваться с последовательностями-мишениями.

Способы приготовления и использования зондов и праймеров описаны, например, в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., vol.1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (ниже "Sambrook et al., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992) (с периодическими обновлениями) (ниже "Ausubel et al., 1992") и Innis et al., PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Пару ПЦР-праймеров можно получить из известной последовательности, например, с помощью компьютерных программ, предназначенных для этой цели, таких как Primer (версии 0.5, ©1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Праймеры и зонды, основанные на flankирующих ДНК и последовательностях вставок, раскрытых здесь, можно использовать для подтверждения (и, если необходимо, для корректировки) раскрытых последовательностей с помощью традиционных способов, например с помощью повторного клонирования и секвенирования таких последовательностей.

Зонды и праймеры настоящего изобретения в виде нуклеиновых кислот гибридизуются в жестких условиях с последовательностью ДНК-мишени. Для установления присутствия ДНК трансгенного случая в образце можно использовать любой традиционный способ гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот. Молекулы нуклеиновых кислот или их фрагменты способны специфически гибридизоваться с другими молекулами нуклеиновых кислот при определенных обстоятельствах. Как здесь используется, говорят, что две молекулы нуклеиновых кислот способны специфически гибридизоваться друг с другом, если две молекулы способны образовывать антипараллельные, двухцепочечные структуры нуклеиновых кислот. Говорят, что молекула нуклеиновой кислоты является "комплémentом" другой молекулы нуклеиновой кислоты, если они проявляют полную комплементарность. Как здесь используется, говорят, что молекулы проявляют "полную комплементарность", если каждый нуклеотид одной молекулы комплементарен нуклеотиду другой молекулы. Говорят, что две молекулы "в минимальной степени комплементарны", если они гибридизуются друг с другом с прочностью, достаточной для того, чтобы позволить им оставаться подвергнутыми отжигу друг с другом в по крайней мере общепринятых условиях "низкой жесткости". Аналогично, говорят, что молекулы "комплémentарны", если они гибридизуются друг с другом с прочностью, достаточной для того, чтобы позволить им оставаться подвергнуты-

ми отжигу друг с другом в общепринятых условиях "высокой жесткости". Общепринятые условия жесткости описываются Sambrook и др. 1989, и Haymes и др. в Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Следовательно, отходы от полной комплементарности допустимы, пока такие отходы не исключают полностью способность молекул образовывать двухцепочечные структуры. Для службы молекулы нуклеиновой кислоты в качестве праймера или зонда требуется только, чтобы ее последовательность была достаточно комплементарна для того, чтобы она могла образовывать стабильную двухцепочечную структуру в конкретных используемых растворителе и концентрациях соли.

Как здесь используется, в значительной степени гомологичная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая будет специфически гибридизоваться с комплементом последовательности нуклеиновой кислоты, с которой ее сравнивают, в условиях высокой жесткости. Соответствующие условия жесткости, которые содействуют гибридизации ДНК, например 6,0×натрия хлорид/натрия цитрат (SSC) при 45°C с последующей промывкой 2,0 SSC при 50°C, хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам, и их можно найти в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Например, концентрацию соли на стадии промывки можно выбрать от низкой жесткости, составляющей приблизительно 2,0×SSC при 5°C, до высокой жесткости, составляющей приблизительно 0,2×SSC при 50°C. Кроме того, температуру на стадии промывки можно увеличить от условий низкой жесткости при комнатной температуре, приблизительно 22°C, до условий высокой жесткости при приблизительно 65°C. Как температура, так и концентрация соли могут варьировать, или может оставаться постоянной или температура, или концентрация соли, в то время как другая переменная будет меняться. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота настоящего изобретения будет специфически гибридизоваться с одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, определенными в SEQ ID NO:1 и 2, или их комплементами или фрагментами тех или других в умеренно жестких условиях, например в приблизительно 2,0×SSC и при приблизительно 65°C. В особенно предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота настоящего изобретения будет специфически гибридизоваться с одной или несколькими молекулами нуклеиновых кислот, определенными в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 или их комплементами или фрагментами тех или других в условиях высокой жесткости. В одном аспекте настоящего изобретения предпочтительная маркерная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения имеет последовательность нуклеиновой кислоты, определенную в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 или их комплементах или фрагментах тех или других. В другом аспекте настоящего изобретения предпочтительная маркерная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения идентична на 80-100% или 90-100% последовательности нуклеиновой кислоты, определенной в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, или ее комплементу или фрагментам той или другой. В дополнительном аспекте настоящего изобретения предпочтительная маркерная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения идентична на 95-100% последовательности, определенной в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, или ее комплементу или фрагментам той или другой. SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 можно использовать в качестве маркеров в способах скрещивания растений для идентификации потомства от генетических скрещиваний, схожих со способами, описанными для простого анализа ДНК-маркера в виде повтора последовательности в DNA-markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 172-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY; все из которых полностью включены сюда посредством ссылки. Гибридизацию зонда с молекулой ДНК-мишенью можно обнаружить с помощью любого ряда способов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам, они могут включать, но без ограничения, флуоресцентные метки, радиоактивные метки, метки на основе антител и хемилюминесцентные метки.

В отношении амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени (например, с помощью ПЦР) с использованием конкретной пары праймеров для амплификации "жесткими условиями" являются условия, которые делают возможной гибридизацию пары праймеров только с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишенью, с которой связывался бы праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплемент), и предпочтительно образование уникального продукта амплификации, ампликона, в термической реакции амплификации ДНК.

Термин "специфический для (последовательности-мишени)" означает, что зонд или праймер гибридизуется в жестких условиях гибридизации только с последовательностью-мишенью в образце, включающем последовательность-мишень.

Как здесь используется, "амплифицированная ДНК" или "ампликон" относится к продукту амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, которая является частью матрицы - нуклеиновой кислоты. Например, для определения того, содержит ли растение кукурузы, являющееся результатом полового скрещивания, геномную ДНК трансгенного случая из растения кукурузы настоящего изобретения, ДНК, экстрагированную из образца ткани растения кукурузы, можно подвергнуть способу амплификации нуклеиновой кислоты с использованием пары праймеров, которая включает праймер, происходящий из flankирующей последовательности в геноме растения, примыкающей к сайту вставки вставленной гетерологичной ДНК, и второй праймер, происходящий из вставленной гетерологичной

ДНК, для образования ампликона, который является диагностическим в отношении присутствия ДНК случая. Ампликон имеет длину и последовательность, которые также диагностируют этот случай. Длина ампликона может находиться в диапазоне от объединенной длины пар праймеров плюс одна пара оснований нуклеотидов, предпочтительно плюс приблизительно пятьдесят пар оснований нуклеотидов, более предпочтительно плюс приблизительно двести пятьдесят пар оснований нуклеотидов и даже более предпочтительно плюс приблизительно четыреста пятьдесят пар оснований нуклеотидов. В альтернативном случае пара праймеров может происходить из фланкирующей последовательности с обеих сторон вставленной ДНК для того, чтобы образовать ампликон, который включает нуклеотидную последовательность всей вставки. Член пары праймеров, происходящий из геномной последовательности растения, может находиться на расстоянии от молекулы вставленной ДНК, это расстояние может находиться в диапазоне от одной пары оснований нуклеотидов до приблизительно двадцати тысяч пар оснований нуклеотидов. Использование термина "ампликон", в частности, исключает димеры праймеров, которые могут образоваться в термической реакции амплификации ДНК.

Амплификацию нуклеиновой кислоты можно проводить любым из различных способов амплификации нуклеиновых кислот, известных в данной области техники, включающих полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Множество способов амплификации известно в данной области техники и описано, между прочим, в патентах США № 4683195 и 4683202 и в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al, Academic Press, San Diego, 1990. Разработаны способы амплификации с помощью ПЦР для амплификации до 22 т.о. геномной ДНК и до 42 т.о. ДНК бактериофага (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5695-5699, 1994). Эти способы, а также другие способы, известные в области амплификации ДНК, можно использовать для осуществления на практике настоящего изобретения. Последовательность вставки гетерологичной ДНК или фланкирующую последовательность случая кукурузы MON89034 с образцами семян, депонированными в виде номеров ATCC, можно подтвердить (и скорректировать, если необходимо) с помощью амплификации таких последовательностей указанного случая, используя праймеры, происходящие из последовательностей, предоставленных здесь, с последующим стандартным секвенированием ДНК полученного с помощью ПЦР ампликона или клонированной ДНК.

Ампликон, образованный с помощью этих способов, можно обнаружить с помощью множества методов. Одним из таких методов является анализ генетических двоичных знаков (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22: 4167-4175, 1994), при котором конструируют ДНК-олигонуклеотид, который перекрывает как примыкающую фланкирующую геномную последовательность ДНК, так и вставленную последовательность ДНК. Олигонуклеотид иммобилизуют в лунках микролуночного планшета. После проведения ПЦР представляющей интерес области (с использованием одного праймера из вставленной последовательности и другого праймера из примыкающей фланкирующей геномной последовательности) одноцепочечный продукт ПЦР может гибридизоваться с иммобилизованным олигонуклеотидом и служить в качестве матрицы для реакции удлинения на одно основание с использованием ДНК-полимеразы и меченых ddNTP, специфичных для следующего ожидаемого основания. Считывание может быть на основе флуоресценции или ELISA. Сигнал означает присутствие вставки/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно основание.

Другим методом является метод пиросеквенирования, описанный Winge (Innov. Pharma. Tech. 00: 18-24, 2000). В этом методе конструируют олигонуклеотид, который перекрывает стык примыкающей геномной ДНК и ДНК вставки. Олигонуклеотид гибридизуется с одноцепочечным продуктом ПЦР представляющей интерес области (с использованием одного праймера из вставленной последовательности и другого праймера из фланкирующей геномной последовательности) и подвергается инкубации в присутствии ДНК-полимеразы, АТР, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденоzin-5'-фосфосульфата и люциферина. dNTP добавляют индивидуально, и включение приводит к световому сигналу, который изменяют. Световой сигнал означает присутствие вставки трансгена/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно или несколько оснований.

Поляризация флуоресценции, описанная Chen и др. (Genome Res. 9: 492-498, 1999) представляет собой метод, который можно использовать для обнаружения ампликона настоящего изобретения. Используя этот метод, конструируют олигонуклеотид, который перекрывает стык геномной фланкирующей и вставленной ДНК. Олигонуклеотид гибридизуется с одноцепочечным продуктом ПЦР представляющей интерес области (с использованием одного праймера из вставленной последовательности и другого праймера из фланкирующей геномной последовательности ДНК) и подвергается инкубации в присутствии ДНК-полимеразы и флуоресцентно меченых ddNTP. Удлинение на одно основание приводит к включению ddNTP. Включение можно определить в виде изменения поляризации, используя флуориметр. Изменение поляризации означает присутствие вставки трансгена/фланкирующей последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно основание.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) описывается как метод обнаружения и количественного определения присутствия последовательности ДНК и полностью истолкован в инструкциях, предоставляемых производителем. Вкратце, конструируют олигонуклеотидный зонд FRET, который перекрывает соединение геномной фланкирующей и вставленной ДНК. Зонд FRET и праймеры для ПЦР (один праймер из последовательности ДНК вставки, а другой праймер из фланкирующей геномной по-

следовательности) подвергаются процессу циклического повторения в присутствии термостабильной полимеразы и dNTP. Гибридизация зонда FRET приводит к расщеплению и отделению флуоресцентной составляющей от гасящей составляющей зонда FRET. Флуоресцентный сигнал означает присутствие фланкирующей последовательности/последовательности вставки трансгена вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Молекулярные маячки описаны для применения для обнаружения последовательности, как описано Tuang и др. (Nature Biotech. 14: 303-308, 1996). Вкратце, конструируют олигонуклеотидный зонд FRET, который перекрывает стык фланкирующей геномной и вставленной ДНК. Уникальная структура зонда FRET приводит к тому, что он обладает вторичной структурой, которая удержит флуоресцентную и гасящую составляющие на близком расстоянии. Зонд FRET и праймеры для ПЦР (один праймер из последовательности ДНК вставки, а другой праймер из фланкирующей геномной последовательности) подвергаются процессу циклического повторения в присутствии термостабильной полимеразы и dNTP. После успешной амплификации с помощью ПЦР гибридизация зонда FRET с последовательностью-мишенью приводит к устраниению вторичной структуры зонда и пространственному разделению флуоресцентной и гасящей составляющих, что приводит к продукции флуоресцентного сигнала. Флуоресцентный сигнал означает присутствие фланкирующей последовательности/последовательности вставки трансгена вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Другие описанные методы, такие как микроструйная техника (заявка на патент США 2006068398, патент США 6544734), обеспечивают способы и устройства для разделения и амплификации образцов ДНК. Описаны оптические красители, используемые для обнаружения и количественного определения специфических молекул ДНК (WO/05017181). Описаны нанотрубные устройства (WO/06024023), которые включают электронный детектор для обнаружения молекул ДНК, или наночастицы, которые связывают специфические молекулы ДНК и затем могут быть обнаружены.

Используя раскрытие здесь композиции, предоставляются наборы для обнаружения ДНК. Наборы пригодны для идентификации ДНК случая кукурузы MON89034 в образце и могут использоваться по крайней мере в способах скрещивания растений кукурузы, содержащих ДНК соответствующего случая. Наборы содержат праймеры и/или зонды в виде ДНК, которые гомологичны или комплементарны сегментам, выбираемым из последовательностей, определенных в SEQ ID NO:1-7, или праймеры или зонды в виде ДНК, которые гомологичны или комплементарны ДНК, содержащейся в трансгенных генетических элементах ДНК, определенной в списке последовательностей. Эти последовательности ДНК могут использоваться в реакциях амплификации ДНК или в качестве зондов в способе гибридизации ДНК для обнаружения присутствия полинуклеотидов, являющихся диагностическими в отношении присутствия ДНК-мишени, в образце. Образование предопределенного ампликона в термической реакции амплификации ДНК диагностирует присутствие ДНК, соответствующей ДНК генома РТА-7455, в образце. Если гибридизация является избранной, обнаружение гибридизации зонда с биологическим образцом диагностирует присутствие ДНК трансгенного случая MON89034 в образце. Как правило, образец представляет собой кукурузу или кукурузные продукты или побочные продукты использования кукурузы.

Настоящим изобретением предоставляется трансгенное растение кукурузы, обозначенное как случай кукурузы MON89034, потомство этого растения и клетки этого растения, а также семя, полученное от этого растения. Типичные семена для выращивания этого растения для получения потомства, для получения клетки или для получения сельскохозяйственной культуры из указанных семян, которые включают случай трансгенной кукурузы, были депонированы 28 марта 2006 г. в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) и имеют номер поступления РТА-7455.

Растение, и клетки, и продукты, получаемые из этих вариантов осуществления, и т.п. содержат ДНК, которая является диагностической в отношении присутствия ДНК, происходящей из любой клетки, происходящей из случая трансгенной кукурузы MON89034, в биологическом образце. Это происходит потому, что эти две новые последовательности содержатся в клетках случая трансгенной кукурузы MON89034. Диагностическая ДНК включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5. Связь этих последовательностей описывается здесь более конкретно и в надписи к фиг. 1 и со ссылкой на фиг. 1.

Растения кукурузы, развившиеся из семян, которые являются гомозиготными по ДНК, являющейся диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Растения кукурузы, развившиеся из семян, которые являются гетерозиготными по ДНК, являющейся диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034, также находятся в пределах объема настоящего изобретения до тех пор, пока эти семена также содержат диагностические последовательности ДНК. Клетки, семена и ткань, полученные из таких растений, содержащие диагностическую ДНК, также находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Растения кукурузы и клетки растения кукурузы и т.п., содержащие ДНК, являющуюся диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034, проявляют устойчивость к заражению чешуекрылыми насекомыми. Эти клетки и растения содержат ДНК, кодирующую инсектицидный белок (инсектицид, токсический агент) Сту2Ab, и ДНК, имеющие нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, которые образуют часть генома клеток растения. Эти растения и клетки растений

также содержат ДНК, кодирующую инсектицидный белок (инсектицид, токсический агент) Сгу1А.105. Эти белки могут упоминаться как первый и второй инсектицидные белки, соответственно, или наоборот. Экспрессия этих белков происходит с регуляторных компонентов/генетических элементов, встроенных в экспрессионные кассеты, обеспечивающие экспрессию каждой из последовательностей ДНК, которые кодируют эти токсины и полностью описаны здесь и в надписи к чертежу и со ссылкой на чертеж, и последовательность, определенную в SEQ ID NO:5. Для защиты растений от заражения чешуекрылыми насекомыми эффективны растения кукурузы и клетки растения кукурузы, включающие эти последовательности, независимо от того, являются ли они гетерозиготными или гомозиготными по аллелям, в которых эти кодирующие последовательности присутствуют.

Настоящим изобретением также предоставляются ампликоны, которые могут образовываться с описанных здесь последовательностей, которые являются диагностическими в отношении присутствия в биологическом образце ДНК, происходящей из ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034. Ампликон, который является диагностическим в отношении присутствия ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034 в биологическом образце, содержит по крайней мере один полинуклеотидный сегмент, состоящий из нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:2. Эти ампликоны могут образовываться с использованием последовательностей праймеров, описанных здесь ниже, с любого биологического образца, который содержит по крайней мере приблизительно 0,5 фемтограмм или приблизительно 0,5 пикограмм ДНК, происходящей из случая трансгенной кукурузы MON89034. Источниками ДНК, соответствующей случаю трансгенной кукурузы MON89034, такого биологического образца может быть кукурузная мука крупного помола, кукурузное масло, кукурузная лепешка, кукурузное семя, зародыш кукурузы, кукурузный крахмал и кукурузная мука и т.п., происходящие из этого трансгенного случая.

Настоящим изобретением также предоставляются выделенные полинуклеотидные молекулы, демонстрирующие непрерывные нуклеотидные последовательности, такие как последовательности, определенные в SEQ ID NO:5. Эти непрерывные нуклеотидные последовательности включают (1) от приблизительно 11 до приблизительно 12000 нуклеотидов и любую промежуточную длину и, кроме того, включают непрерывные нуклеотиды, определенные в положениях нуклеотидов 1-11 или 9-20 в SEQ ID NO:1 и 1-11 или 9-20, указанных в SEQ ID NO:2; (2) любую непрерывную нуклеотидную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 3 длиной от приблизительно 11 до приблизительно 2000 нуклеотидов или любой промежуточной длины, и, кроме того, включают непрерывные нуклеотиды, определенные в положениях нуклеотидов 1-11 или 9-20, указанных в SEQ ID NO:1; любую непрерывную нуклеотидную последовательность, определенную в SEQ ID NO:4 длиной от приблизительно 11 до приблизительно 914 нуклеотидов и любой промежуточной длины, и, кроме того, включают непрерывные нуклеотиды, определенные в положениях нуклеотидов 1-11 или 9-20, указанных в SEQ ID NO:2. Эти выделенные полинуклеотидные молекулы пригодны в способах амплификации ДНК для образования одного или нескольких ампликонов с биологического образца, содержащего кукурузную ДНК. Обнаружение такого ампликона диагностирует присутствие ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034 в образце. Выделенные полинуклеотидные молекулы также пригодны в различных способах обнаружения нуклеотидов для обнаружения присутствия ДНК, происходящей из случая трансгенной кукурузы MON89034, в биологическом образце. В частности, в качестве зондов в таких способах обнаружения ДНК трансгенного случая MON89034 в образце пригодны полинуклеотидные зонды, включающие по крайней мере приблизительно 11 непрерывных нуклеотидов, определенных в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. Комплементарные последовательности этих выделенных полинуклеотидных молекул также пригодны для тех же способов обнаружения и/или амплификации.

Настоящим изобретением также предоставляются наборы, используемые для обнаружения присутствия ДНК, происходящей из случая трансгенной кукурузы MON89034, в биологическом образце. В наборе используется зонд в виде полинуклеотидной молекулы, молекула зонда, содержащая по крайней мере от приблизительно 11 до приблизительно 12000 непрерывных нуклеотидов, в значительной степени гомологичная или в значительной степени комплементарная нуклеотидному сегменту, включающему последовательность, определенную в SEQ ID NO:5, была бы пригодна для обнаружения присутствия ДНК MON89034 в образце. Молекула зонда должна содержать по крайней мере одну из последовательностей, определенных в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2. Последовательности, определенные в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, могут также упоминаться как последовательности стыка, т.е. последовательности на одном из двух концов трансгенной ДНК, вставленной в растение кукурузы для получения случая трансгенной кукурузы MON89034. Эти последовательности, произвольно упоминаемые как 5'- и 3'-концы соответственно, содержат часть вставленной последовательности ДНК и часть фланкирующей геномной последовательности кукурузы. Например, SEQ ID NO:1 воспроизводит на своей 5'-половине 3'-конец геномной последовательности кукурузы, фланкирующей 5'-конец вставленной ДНК, 5'-конец вставленной ДНК, представленный 3'-концевой половиной последовательности, определенной в SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:2 воспроизводит на своей 5'-половине 3'-конец вставленной ДНК и на своей 3'-концевой половине 5'-конец геномной последовательности кукурузы, фланкирующей 3'-конец вставленной ДНК. Во встречающемся в природе геноме кукурузы в положении вставленной последовательности,

определенной в SEQ ID NO:5, фланкирующая последовательность на 5'-конце вставленной ДНК и фланкирующая последовательность на 3'-конце вставленной ДНК соединены, и молекула первого праймера, которая гибридизуется с последовательностью, комплементарной последовательности, определенной в SEQ ID NO:3, (отличной от 21 нуклеотидов 3'-конца SEQ ID NO:3) и молекула второго праймера, которая гибридизуется с последовательностью, определенной в SEQ ID NO:4, (отличной от 20 нуклеотидов 5'-конца SEQ ID NO:4) будут приводить к образованию ампликона в термической реакции амплификации с матрицей, являющейся ДНК, отличной от ДНК MON89034, что диагностирует отсутствие вставленной ДНК в MON8 9034, и те же праймеры будут приводить к образованию ампликона, который слегка больше чем 12000 нуклеотидов (в зависимости от положения праймеров во фланкирующих последовательностях, определенных в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4) при использовании ДНК MON89034 в качестве матрицы.

Предоставляется набор для обнаружения последовательности стыка SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 случая кукурузы MON89034 в биологическом образце. Набор содержит полинуклеотидный зонд, который представляет собой последовательность, выбиравшую из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или их комплементов, или полностью комплементарен указанной последовательности, и также содержит пару праймеров для применения в реакции амплификации нуклеиновой кислоты. Пара праймеров может упоминаться как первый праймер, состоящий из по крайней мере от приблизительно 15 до приблизительно 50 непрерывных нуклеотидов из части генома кукурузы SEQ ID NO:3, и второй праймер, состоящий из по крайней мере от приблизительно 15 до приблизительно 50 непрерывных нуклеотидов, комплементарных части гетерологичной ДНК вставки SEQ ID NO:5. Первый праймер пары полинуклеотидных праймеров специфически гибридизуется с обратно комплементарной последовательностью, соответствующей последовательности, определенной в SEQ ID NO:3 от приблизительно положения нуклеотида 1 по приблизительно положения 2050, а второй праймер указанной пары полинуклеотидных праймеров специфически гибридизуется с последовательностью, определенной в SEQ ID NO:5 от приблизительно положения нуклеотида 2060 по приблизительно положения нуклеотида 12208, и удлиняются в направлении друг к другу с образованием ампликона, который включает SEQ ID NO:1, при этом указанный ампликон является диагностическим в отношении присутствия ДНК случая MON89034 в образце. Отличная пара праймеров может упоминаться как первый праймер, состоящий из по крайней мере от приблизительно 15 до приблизительно 50 непрерывных нуклеотидов, комплементарных части генома кукурузы SEQ ID NO:4, и второй праймер, состоящий из по крайней мере от приблизительно 15 до приблизительно 50 непрерывных нуклеотидов из части гетерологичной ДНК вставки SEQ ID NO:5. Второй праймер пары полинуклеотидных праймеров специфически гибридизуется с обратно комплементарной последовательностью, соответствующей последовательности, определенной в SEQ ID NO:5 от приблизительно положения нуклеотида 1 по приблизительно положения 11305, а первый праймер пары полинуклеотидных праймеров специфически гибридизуется с последовательностью, определенной в SEQ ID NO:4 от приблизительно положения нуклеотида 21 по приблизительно положения нуклеотида 914, и удлиняются в направлении друг к другу с образованием ампликона, который включает SEQ ID NO:2, при этом указанный ампликон является диагностическим в отношении присутствия ДНК случая MON89034 в указанном образце.

Эти пары праймеров пригодны для образования ампликонов, которые включают или SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, согласно случаю, и, следовательно, являются диагностическими в отношении присутствия ДНК MON89034 в биологическом образце. Эти ампликоны делают возможным обнаружение присутствия последовательности стыка, являющейся диагностической в отношении случая кукурузы MON89034, в биологическом образце.

Также предоставляется способ образования и обнаружения ампликона, который является диагностическим в отношении ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034, в биологическом образце, содержащем ДНК кукурузы. Способ включает приведение в контакт биологического образца с двумя или более праймерами в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, затем обнаружение ампликона. Присутствие ампликона диагностирует ДНК указанного случая в образце до тех пор, пока ампликон содержит по крайней мере одну из непрерывных последовательностей, определенных в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, в приблизительно положениях нуклеотидов 1-11 или 9-20, или комплементарные последовательности, соответствующие этим положениям.

Нуклеотидные последовательности, которые являются диагностическими в отношении присутствия случая трансгенной кукурузы MON89034 в биологическом образце, можно также обнаружить, используя другие способы. Например, приведением в контакт биологического образца с подозрением на содержание ДНК MON89034 с зондом, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с одной или более нуклеотидными последовательностями, определенными в SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, подверганием образца и зонда жестким условиям гибридизации и затем обнаружением гибридизации зонда с нуклеотидной последовательностью. Обнаружение гибридизации диагностирует присутствие ДНК MON89034 в образце.

Настоящим изобретением также предоставляются праймеры в виде полинуклеотидов для применения в образовании, в термической реакции амплификации, ампликона, который является диагностиче-

ским в отношении присутствия ДНК случая кукурузы MON89034 в биологическом образце. Обычно праймеры предоставляются в парах, при этом члены пары праймеров упоминаются, для удобства, как первый праймер и второй праймер. Первый праймер может состоять из по крайней мере приблизительно 15 непрерывных нуклеотидов из части генома кукурузы, определенной в SEQ ID NO:3, а второй праймер может состоять из по крайней мере приблизительно 15 непрерывных нуклеотидов, комплементарных части гетерологичной ДНК вставки, определенной в SEQ ID NO:5. Эти два праймера приводили бы к образованию ампликона в термической реакции амплификации с матричной ДНК, полученной из ДНК случая кукурузы MON89034, который содержит полинуклеотидную последовательность, определенную в SEQ ID NO:1. В альтернативном случае первый праймер может состоять из по крайней мере приблизительно 15 непрерывных нуклеотидов из части генома кукурузы, определенной в SEQ ID NO:4, а второй праймер может состоять из по крайней мере приблизительно 15 непрерывных нуклеотидов, комплементарных части гетерологичной ДНК вставки, определенной в SEQ ID NO:5. Эти два праймера приводили бы к образованию ампликона в термической реакции амплификации с матричной ДНК, полученной из ДНК случая кукурузы MON89034, который содержит полинуклеотидную последовательность, определенную в SEQ ID NO:2.

Альтернативный способ обнаружения последовательности стыка случая кукурузы MON89034 в биологическом образце, содержащем ДНК кукурузы, такую как SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, состоит из приведения в контакт образца с полинуклеотидным зондом, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с одной из последовательностей стыка, подвергания образца и зонда жестким условиям гибридизации и обнаружения гибридизации зонда с последовательностью стыка. Обнаружение связывания/гибридизации зонда с последовательностью стыка является индикатором присутствия ДНК MON89034 в биологическом образце. В пределах объема настоящего изобретения находится стабильно трансформированное растение кукурузы, ДНК из которого приводит к образованию ДНК-ампликона, включающего SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, при подвергании способу, указанному здесь. Приводимые в качестве примеров последовательности праймеров, в частности, пары последовательностей праймеров, указаны здесь в примерах и в SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7.

Альтернативный способ обнаружения присутствия ДНК случая кукурузы MON89034 в биологическом образце может состоять из стадий приведения в контакт образца с зондом, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с ДНК MON89034 и не гибридизуется в жестких условиях гибридизации с геномной ДНК растения кукурузы, которая не является ДНК MON89034, подвергания образца и зонда жестким условиям гибридизации и обнаружения гибридизации зонда с ДНК MON89034. Подходящий для этого варианта осуществления зонд является последовательностью, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, или комплементарен такой последовательности. Обнаружение гибридизации зонда с образцом диагностирует присутствие полинуклеотида случая кукурузы MON89034 в образце. Биологическим образом может быть любой образец, содержащий ДНК MON89034, включающий, но без ограничения, кукурузное масло, кукурузную муку крупного помола, кукурузную муку, кукурузную клейковину, кукурузные лепешки, кукурузный крахмал, жидкий кукурузный экстракт, ткань кукурузы, клетки кукурузы, кукурузное зерно, пыльцу кукурузы, корневую ткань кукурузы, DDGS и даже этанол, продуцируемый в качестве побочного продукта сбраживания такой трансгенной кукурузы, до тех пор, пока образец содержит по крайней мере определяемое количество полинуклеотида, который является диагностическим в отношении присутствия случая MON89034 в образце. Полинуклеотидный зонд может быть любым нуклеотидом, выбираемым из группы, состоящей из дезоксирибонуклеиновой кислоты, рибонуклеиновой кислоты и аналога нуклеотида, и может быть помечен по крайней мере одним флуорофором, молекулой, содержащей радиоактивный изотоп, или молекулой типа гаптена, которую можно специфически обнаружить с помощью антитела или другой реакцией типа связывания.

Сорт кукурузы, содержащий ДНК, которая является диагностической в отношении присутствия ДНК трансгенного случая MON89034, можно получить скрещиванием растения кукурузы, содержащего ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034, с растением кукурузы, отличным от случая MON89034, для получения гибридного растения кукурузы, содержащего ДНК, которая является диагностической в отношении указанного случая. В пределах объема настоящего изобретения находится такое гибридное растение кукурузы, содержащее ДНК, которая является диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034, например семя, полученное от гибрида (пока оно содержит ДНК, являющуюся диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034) и пыльца, семяпочка, семя, корни или листья гибридного растения кукурузы MON89034, также пока они содержат диагностические последовательности ДНК, и потомство, получаемое от таких вариантов осуществления настоящего изобретения.

Настоящим изобретением предоставляется способ защиты растения кукурузы от заражения чешуекрылыми насекомыми, включающий обеспечение в пище целевого вредителя - чешуекрылого насекомого одной или нескольких клеток трансгенного растения кукурузы, при этом каждая клетка растения кукурузы содержит в своем геноме полинуклеотид, соответствующий последовательности, определенной и в SEQ ID NO:1, и в SEQ ID NO:2, и непрерывную нуклеотидную последовательность, определенную в

SEQ ID NO:5 между SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2. Дальнейшее кормление целевого чешуекрылого насекомого, которое питается такими клетками трансгенного растения кукурузы, подавляется на растении кукурузы, из которого происходят указанные клетки растения кукурузы.

Настоящим изобретением также предоставляются композиции, являющиеся токсичными для целевых чешуекрылых вредителей растений кукурузы. Композиция клеток трансгенного растения, обеспечиваемая в пище целевого вредителя - чешуекрылого насекомого, в которой каждая клетка трансгенного растения кукурузы содержит в своем геноме полинуклеотид, соответствующий последовательности, определенной и в SEQ ID NO:1, и в SEQ ID NO:2, вместе с непрерывной нуклеотидной последовательностью, определенной в SEQ ID NO:5 между SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, эффективна для обеспечения защиты от заражения чешуекрылыми насекомыми растения кукурузы или клетки растения кукурузы до тех пор, пока растение кукурузы или клетка экспрессируют CgylA.105 и/или Cgyl2Ab2 с экспрессионных кассет, содержащихся в непрерывной нуклеотидной последовательности. Такие композиции, в форме семян трансгенной кукурузы, были депонированы в Американскую коллекцию типовых культур под номером поступления РТА-7455. Такие устойчивые к насекомым растения кукурузы, или их части, будут содержать ДНК в геноме клеток такого растения, которые имеют по крайней мере одну нуклеотидную последовательность, выбиравшую из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5. В объем настоящего изобретения также включены потомство и семя устойчивого к насекомым растения кукурузы, у которых имеются упоминаемые здесь диагностические последовательности. Такие устойчивые к насекомым растения кукурузы можно получить способом, включающим скрещивание случая трансгенного растения кукурузы MON89034 с отличным растением кукурузы и отбор устойчивого к насекомым потомства с помощью анализа на по крайней мере одну нуклеотидную последовательность, выбиравшую из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5.

Случай устойчивой к насекомым трансгенной кукурузы MON89034 можно объединить с другими трансгенными сортами кукурузы, такими как кукуруза, устойчивая к гербицидам, таким как глифосат, глюфосинат и диакамба и т.п., или кукуруза, устойчивая к уничтожающим корни насекомым в результате вставки последовательностей, кодирующих такие белки, как PS149B1 и модифицированный Cgyl3Bb, или другими сортами трансгенной кукурузы, устойчивой к заражению чешуекрылыми насекомыми в результате вставки последовательностей, кодирующих другие токсичные белки, такие как VIP3a, Cgyl1Ab и Cgyl1Fa, и т.п. Различные комбинации всех этих различных трансгенных случаев скрещиваются с растениями кукурузы настоящего изобретения, т.е. случаем MON89034, для получения улучшенных сортов гибридной трансгенной кукурузы, устойчивой к заражению жестокрылыми и чешуекрылыми и устойчивой к выборочным гербицидам. Такие сорта проявляют улучшенные выход и свойства переносить засуху по сравнению с нетрансгенными сортами и трансгенными сортами с индивидуальным признаком.

Предоставляется способ получения растения кукурузы, устойчивого к заражению насекомыми, которое включает инсектицидно эффективное количество кодирующих токсины последовательностей, определенных в SEQ ID NO:5. Способ включает выделение кодирующих токсины последовательностей из случая трансгенной кукурузы MON8 9034 и введение этих кодирующих последовательностей, по отдельности или вместе, в одну или несколько клеток кукурузы для получения трансгенных клеток кукурузы, содержащих эту одну или несколько кодирующих токсины последовательностей. Трансгенные клетки кукурузы затем выращивают (регенерируют) в трансгенные растения кукурузы, содержащие одну или несколько кодирующих последовательностей, и трансгенные растения затем проявляют устойчивость к заражению насекомыми.

Настоящим изобретением предоставляется способ определения зиготности ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего ДНК случая кукурузы MON89034, по ДНК, которая является диагностической в отношении присутствия такой ДНК MON89034 в биологическом образце. Способ состоит из, в качестве первой стадии, приведения в контакт образца с тремя различными праймерами, включающими SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:10, которые при использовании вместе в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, включающей ДНК случая кукурузы MON89034, приводят к образованию первого ампликона, который является диагностическим в отношении случая кукурузы MON89034, а при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, включающей геномную ДНК кукурузу, отличную от ДНК MON89034, приводят к образованию второго ампликона, который является диагностическим в отношении геномной ДНК кукурузы, отличной от ДНК MON89034. Последующие стадии состоят из проведения реакции амплификации нуклеиновой кислоты и сравнения ампликонов, образованных во время термической реакции амплификации. Обнаружение присутствия обоих ампликонов диагностирует зиготность образца. Обнаружение только первого ампликона означает, что образец содержит только ДНК MON89034, т.е. является гомозиготным образцом. Обнаружение только второго ампликона означает, что образец не содержит ДНК MON89034. Обнаружение и первого ампликона, и второго ампликона вместе в образце означает, что (1) образец содержит гетерозиготную ДНК, что касается чистого образца, содержащего только гетерозиготный исходный материал, или (2) образец содержит и гомозиготную, и гетерозиготную ДНК исходного образца, или (3) образец содержит некоторую комбинацию гомозиготной, гетерозиготной ДНК и/или образцов, отличных от ДНК MON89034.

Настоящим изобретением также предоставляются растущие растения кукурузы, содержащие ДНК, являющуюся диагностической в отношении трансгенного ДНК-сегмента, вставленного в геном клеток растений кукурузы. ДНК в геноме клеток кукурузы включает какую-либо одну или все последовательности, выбираемые из группы, состоящей из:

- (а) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:5;
- (б) обеих нуклеотидных последовательностей, определенных в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2;
- (с) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:3; и
- (д) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:4.

Ниже следующие примеры включены для демонстрации примеров некоторых предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Квалифицированным в данной области техники специалистам должно быть понятно, что методы, раскрытые в ниже следующих примерах, представляют собой подходы, которые, как обнаружено авторами настоящего изобретения, хорошо функционируют при осуществлении на практике настоящего изобретения и поэтому могут считаться примерами предпочтительных вариантов его осуществления на практике. Однако квалифицированным в данной области техники специалистам в свете раскрытия настоящего изобретения должно быть понятно, что в конкретные раскрытые варианты осуществления настоящего изобретения можно внести много изменений, и все еще получить подобный или схожий результат, не выходя за пределы существа и объема изобретения.

### Примеры

#### Пример 1.

В этом примере иллюстрируется конструирование и молекулярное свойство случая трансгенной кукурузы MON89034.

Растение кукурузы MON89034 получали с помощью процесса опосредуемой *Agrobacterium* трансформации линии самоопыляющейся кукурузы плазмидной конструкцией pMON38850 (экспрессионная кассета показана на чертеже). Используемый способ трансформации схож со способом, описанным в патенте США № 6603061. Плазмидная конструкция pMON38850 содержит экспрессирующуюся в растениях кассету, связанные с регуляторными генетическими элементами, необходимыми для экспрессии инсектицидного белка Cry1A.105 в клетках растения кукурузы. Клетки кукурузы регенерировали в целые растения кукурузы, состоящие из по крайней мере 23000 различных трансгенных случаев. Из популяции случаев отбирали индивидуальные трансгенные случаи (растения), которые демонстрировали целостность экспрессирующихся в растениях кассет и устойчивость к личинкам насекомых отряда Lepidoptera, поддерживающим повреждение. Растение кукурузы, содержащее в своем геноме связанные экспрессирующиеся в растениях кассеты pMON38850, представляет собой аспект настоящего изобретения. После капитального анализа этих трансгенных случаев отобрали трансгенный случай MON89034 на основе молекулярного свойства и отсутствия каких-либо нежелательных фенотипических или агрономических эффектов, вызванных нехваткой.

Последовательности генетических элементов трансгена, содержащиеся в геноме кукурузы MON89034, как проиллюстрировано на чертеже, состоят из следующих элементов, при этом каждый из них находится в функциональной связи с каждым другим элементом. Во-первых, на произвольно определенном 5'-конце последовательности (т.е. около левой центральной части сегмента, изображенного на чертеже) отмечена часть правой краевой области (RB) из *Agrobacterium tumefaciens*. За ней следует одна за другой экспрессионная кассета, состоящая из энхансерного промоторного элемента CaMV.35S (упоминаемого здесь как P-CaMV35SEn, находящегося в положениях 2350-2651 SEQ ID NO:5); нетранслируемая лидерная последовательность связывающего с хлорофиллом A/B белка пшеницы (упоминаемая здесь как L-Ta.lhcb1, находящаяся в положениях 2678-2738 SEQ ID NO:5); последовательность интрана актина риса (упоминаемая здесь как I-Os.Act1, находящаяся в положениях 2755-3234 SEQ ID NO:5); не встречающаяся в природе последовательность, кодирующая химерный ген Cry1A.105 (находящаяся в положениях 3244-6777 SEQ ID NO:5); и 3'-концевая область из пшеницы (упоминаемая здесь как T-Ta.Hsp17-1:1:1, находящаяся в положениях 6809-7018 SEQ ID NO:5). Комбинация упомянутых выше элементов, отличных от краевой последовательности, при нахождении в растении кукурузы функционируют вместе с вызовом экспрессии инсектицидного белка Cry1A.105. Эти элементы затем связывают одни за другими с другой экспрессионной кассетой, состоящей из следующих элементов: промотора Figwort mosaic (находящегося в положениях 7086-7649 SEQ ID NO:5), лидерной последовательности Hsp70 Zea mays (упоминаемой здесь как HSP70 или I-Hsp70, находящейся в положениях 7672-8475 SEQ ID NO:5); и последовательности, кодирующей пептид для переноса в хлоропласт Zea mays (упоминаемой здесь как CTR2 или TS-SSU-CTR, находящейся в положениях 8492-8892 SEQ ID NO:5). Эти функционально связанные сегменты затем связывают с нуклеотидной последовательностью, кодирующей инсектицидный белок Cry2Ab (находящейся в положениях 8893-10800 SEQ ID NO:5), которая связана на своем 3'-конце с 3' нетранслируемой областью гена нопалинсингтазы *Agrobacterium tumefaciens* (упоминаемой здесь как T-AGRtu.nos-1:1:13, находящейся в положениях 10827-11377 SEQ ID NO:5). Эти элементы, фланкирующие кодирующую Cry2Ab последовательность, функционируют вместе для управления экспрессии Cry2Ab при нахождении в растении кукурузы. За экспрессирующую Cry2Ab кассетой затем следует одна за другой нуклеотидная последовательность, состоящая из значительной части левой краевой

области (LB) из *Agrobacterium tumefaciens*.

ДНК-молекулы, пригодные для применения в качестве праймеров в способах амплификации ДНК, могут происходить из последовательностей генетических элементов вставки трансгена, содержащейся в случае MON89034. Эти молекулы праймеров можно использовать в качестве части набора праймеров, который также включает молекулу ДНК-праймера, происходящую из генома случая, фланкирующего вставку трансгена.

Часть ДНК плазмиды pMON38850, вставленная в геном кукурузы, приводящая к случаю трансгенного растения кукурузы MON89034, состоящая из левого и правого краевых сегментов и двух связанных экспрессирующихся в растениях кассет (первой экспрессионной кассеты, кодирующей Сгу1А.105, и второй экспрессионной кассеты, кодирующей Сгу2Ab, причем каждая кассета может быть взаимозаменяемой в отношении того, что она может быть предназначена быть первой или второй кассетой), между краевыми сегментами, была охарактеризована с помощью детальных молекулярных анализов. Эти анализы проводили для идентификации случаев, содержащих только один и целый вставленный сегмент, состоящий из краевых областей и двух желательных экспрессионных кассет между краевыми областями, (числа сайтов интеграции в пределах генома кукурузы), числа копий (числа копий используемой для трансформации ДНК в пределах одного локуса) и целостности вставленных генных кассет (т.е. отсутствия любой перестройки или вариации последовательности по сравнению с последовательностью, которая, как известно, присутствует в плазмиде pMON38850). Были использованы молекулярные ДНК-зонды, которые включали интактную кодирующую Сгу1А.105 область и ее соответствующие регуляторные элементы, промоторы, интроны и последовательности полиденилирования экспрессирующихся в растениях кассет, и ДНК-область основы плазмиды pMON38850. Данные, полученные от анализов всех случаев, продемонстрировали, что MON89034 содержит единственную вставку используемой для трансформации ДНК с одной копией экспрессирующей Сгу1А.105 кассетой. В геноме MON89034 не обнаружено дополнительных элементов из трансформирующего вектора pMON38850, связанных или несвязанных с интактными генными кассетами. Наконец, были проведены ПЦР и анализы последовательностей ДНК для определения 5' и 3' стыков вставки с геном растения, для подтверждения организации элементов в пределах вставки (см., например, чертеж) и определения полной последовательности ДНК, вставленной в геном растения кукурузы, приводящих к случаю трансгенной кукурузы MON89034. Полная вставленная последовательность, вместе с частью фланкирующих последовательностей генома кукурузы с каждого из двух концов вставленной ДНК, изображена в последовательности, определенной в SEQ ID NO:5.

Геномную ДНК из MON89034 и нетрансгенную ДНК из кукурузы, отличной от MON89034, (контрольную ДНК) выделяли из семени кукурузы, сначала, переработкой семени (до 200 семян) в тонкоизмельченный порошок во встряхивателе для краски Harbil 5G-HD (Habil Inc., Cincinnati, Ohio). Вкратце, порошкообразное семя экстрагировали в буфер для экстракции (№ в каталоге EM Science - 3700, EM Science, Gibbstown, New Jersey, США), и ДНК осаждали из раствора изопропанолом (№ в каталоге Sigma - I-0398, Sigma, St. Louis, MO, США). Осажденную ДНК соскабливали в микроцентрифужную пробирку, содержащую 70% этанола. ДНК осаждали в микроцентрифуге при максимальной скорости (~14000 об/мин) в течение ~ 5 мин, сушили под вакуумом и повторно растворяли в буфере TE (pH 8,0). ДНК затем хранили в холодильнике при 4°C. Квалифицированный в данной области специалист может модифицировать этот способ для выделения ДНК из одного семени кукурузы.

Приводимые в качестве примеров способы, используемые для идентификации случая MON89034 в образце, описываются в ПЦР Таатап специфического для случая конечного положения, для которой примеры условий описываются в табл. 1 и 2. ДНК-праймерами, используемыми в этом анализе, являются праймеры SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), меченный 6FAM™ праймер PB880 (SEQ ID NO:14) и меченный VIC™ праймер PB2931 (SEQ ID NO:15). 6FAM и VIC являются продуктами Applied Biosystems (Foster City, CA) в виде флуоресцентных красителей, присоединенными к ДНК-праймерам. В случае зондов TAQMAN® MGB 5'-эзонуклеазная активность ДНК-полимеразы Таа расщепляет зонд с 5'-конца, между флуорофором и гасителем. При гибридизации с цепью ДНК-мишенью гаситель и флуорофор достаточно разделяются в трехмерном пространстве с продуцированием флуоресцентного (длины волны возбуждения флуорофора) сигнала.

SQ2842 (SEQ ID NO:6) и SQ2843 (SEQ ID NO:7) при использовании в этих способах реакций с PB880 (SEQ ID NO:14) приводят к образованию ДНК-ампликона, который является диагностическим в отношении ДНК случая MON89034. Контроли для этого анализа должны включать положительный контроль из кукурузы, содержащей ДНК случая MON89034, отрицательный контроль из нетрансгенной кукурузы или из трансгенной кукурузы, отличной от случая MON89034, и отрицательный контроль, который не содержит матричной ДНК.

SQ1564 (SEQ ID NO:17) и SQ1565 (SEQ ID NO:18) при использовании в этих способах реакций с PB351 (SEQ ID NO:21) приводят к образованию ампликона, который является диагностическим в отношении Сгу1А.105 в MON89034.

Эти анализы оптимизируют для использования с системой для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, или робоциклером Stratagene, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, или термоциклером Ер-

pendorf Mastercycler Gradient. Другие способы и устройства, известные квалифицированным в данной области техники специалистам, которые позволяют образовать ампликоны, которые идентифицируют ДНК случая MON89034, находятся в пределах знаний в данной области техники.

Любой зонд, который специфически связывается с SEQ ID NO:1 или ее идеально комплементарной последовательностью в биологическом образце и содержит по крайней мере 11 непрерывных нуклеотидов, определенных в SEQ ID NO:1, или в качестве возможного случая обратно комплементарной последовательности в SEQ ID NO:1, пока связывание может быть обнаружено, диагностирует присутствие ДНК случая кукурузы MON89034 в этом образце. Любой зонд, который специфически связывается с SEQ ID NO:2 или ее идеально комплементарной последовательностью в биологическом образце и содержит по крайней мере 11 непрерывных нуклеотидов, определенных в SEQ ID NO:2, или в качестве возможного случая обратно комплементарной последовательности в SEQ ID NO:2, пока связывание может быть обнаружено, диагностирует присутствие ДНК случая кукурузы MON89034 в этом образце.

В пределах объема настоящего изобретения, как считается, находится любая пара праймеров, используемая или предназначенная для использования для образования ампликона с биологического образца, включающего ДНК кукурузы, и ампликон включает или SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, или в качестве возможного случая он включает обе эти последовательности. Любой такой ампликон, включающий или SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, или обе эти последовательности, считается для раскрытий здесь целей настоящего изобретения диагностическим в отношении присутствия ДНК случая кукурузы MON89034 в таком биологическом образце. Предоставляется следующий пример в качестве справки для квалифицированного в данной области техники специалиста.

Таблица 1. ПЦР Тацман специфического для случая кукурузы MON89034 конечного положения

Стадия	Реагент	Количество	Комментарии
1	Свободная от нуклеаз вода	Добавить до конечного объема 10 мкл	-
2	2 X универсальная главная смесь (Applied Biosystems, каталожный # 4304437)	5 мкл	IX конечная концентрация
3	Праймеры SQ2842 (SEQ ID NO:6) и SQ2843 (SEQ ID NO: 7), ресуспендированные в свободной от нуклеаз воде до концентрации 20 мкМ, каждый)	0,5 мкл	1,0 мкМ конечная концентрация
4	Меченный 6AM™ праймер PB880 (SEQ ID NO:14) (ресуспендированный в свободной от нуклеаз воде до концентрации 10 мкМ)	0,2 мкл	0,2 мкМ конечная концентрация
5	Праймер внутреннего контроля SQ2842 и праймер внутреннего контроля SQ2843	0,2 мкл	0,2 мкМ конечная концентрация
6	Экстрагированная ДНК (матрица): - Анализируемые образцы (индивидуальные листья) - Отрицательный контроль - Отрицательный контроль - Положительный контроль - Положительный контроль	3,0 мкл - 4-80 нг геномной ДНК - 4 нг геномной ДНК нетрансгенной кукурузы - без ДНК-матрицы (раствор, в котором ресуспендирована ДНК) - 4 нг геномной ДНК из известного случая гетерозиготной кукурузы MON89034 - 4 нг геномной ДНК из известного случая гомозиготной кукурузы MON89034	Разведенная в воде
7	Осторожно смешать, добавить 1-2 капли минерального масла на верх каждой реакции		

Амплификацию ДНК можно наладить и провести с использованием любого способа термоцикличе-

ского повторения, в том числе ручного манипулирования или электронно контролируемого манипулирования температурными стадиями и циклами. Для ведения следующих параметров циклического повторения использовались робоциклер Stratagene, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, или термоциклер Eppendorf Mastercycler Gradient, или система для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, или термоциклеры MJ Research DNA Engine PTC-225. При проведении ПЦР в Eppendorf Mastercycler Gradient или MJ Engine термоциклер работал циклами рассчитанным образом. При использовании Perkin-Elmer 9700 условия повторения циклов сопровождались скоростью отслеживания нагрузки, установленной на максимум.

Таблица 2. Условия термоциклира для анализа зиготности

Число циклов	Установки: система для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
1	50°C 2 минуты
1	95°C 10 минут
10	95°C 15 секунд 64°C 1 минута (-1°C/цикл)
30	95°C 15 секунд 54°C 1 минута
1	10°C выдержка

Пример 2.

В этом примере иллюстрируются идентификация растения кукурузы, содержащего ДНК, являющуюся диагностической в отношении случая трансгенной кукурузы MON89034, в своем геноме, и определение зиготности такого растения кукурузы.

Способы, используемые для идентификации гетерозиготного относительно гомозиготного потомства, содержащего ДНК случая MON89034 в своем геноме, описываются в анализе зиготности, для которого условия приводятся в качестве примеров в табл. 3 и 4. Приводимыми в качестве примеров ДНК-праймерами, используемыми в анализе зиготности, являются праймеры SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), SQ6523 (SEQ ID NO:10), SQ6524 (SEQ ID NO:11), меченный 6FAM™ праймер PB880 (SEQ ID NO:14) и меченный VIC™ праймер PB2931 (SEQ ID NO:15). Как указано выше, 6FAM и VIC являются продуктами Applied Biosystems (Foster City, CA) в виде флуоресцентных красителей, присоединенными к ДНК-праймеру.

SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), SQ6523 (SEQ ID NO:10), SQ6524 (SEQ ID NO:11) при использовании вместе в термической реакции амплификации, в которой биологический образец, содержащий матричную ДНК, содержит ДНК, являющуюся диагностической в отношении присутствия случая кукурузы MON89034 в образце, приводят к образованию ДНК-ампликона, являющегося диагностическим в отношении ДНК кукурузы, отличной от ДНК случая кукурузы MON89034 (независимо от того, получена ли ДНК кукурузы из нетрансгенного или некоторого другого трансгенного образца). В альтернативном случае в реакции будут образовываться два различных ДНК-ампликона с биологического образца, содержащего ДНК, происходящую из генома кукурузы, который является гетерозиготным по аллелю, соответствующему вставленной ДНК, присутствующей в случае трансгенной кукурузы MON89034. Эти два различных ампликона будут соответствовать первому ампликону, который происходит из локуса генома кукурузы дикого типа, и второму ампликону, который является диагностическим в отношении присутствия ДНК случая кукурузу MON89034. Образец ДНК кукурузы, который приводит к получению только одного ампликона, соответствующего второму ампликону, описанному для гетерозиготного генома, диагностируют присутствие случая кукурузы MON89034 в образце и является диагностическим для определения того, что ДНК кукурузы, использованная в качестве матрицы, происходит из семени кукурузы, которое является гомозиготным по аллелю, соответствующему вставленной ДНК случая трансгенной кукурузы MON89034. Контроли для этого анализа должны включать положительный контроль из гомозиготной и гетерозиготной кукурузы, содержащей ДНК случая MON89034, отрицательный контроль из нетрансгенной кукурузы или любого другого трансгенного сорта кукурузы, и отрицательный контроль, который не содержит матричной ДНК. Этот анализ оптимизируют для использования с робоциклером Stratagene, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 или термоциклером Eppendorf Mastercycler Gradient. Другие способы и устройства, известные квалифицированным в данной области техники специалистам, которые позволяют образовать ампликоны, которые идентифицируют зиготность потомства от скрещиваний, производимых с растениями MON89034, находятся в пределах знаний в данной области техники.

Таблица 3. Решения реакций для анализа зиготности

Стадия	Реагент	Количество	Комментарии
1	Свободная от нуклеаз вода	Добавить до конечного объема 5 мкл	-
2	2 X универсальная главная смесь (Applied Biosystems, каталожный # 4304437)	2,5 мкл	1 X конечная концентрация
3	Праймеры SEQ ID NO 6 и SEQ ID NO: 7, (рессуспендированные в свободной от нуклеаз воде до концентрации 20 мкМ)	0,05 мкл	0,25 мкМ конечная концентрация
4	Меченный 6FAM™ праймер PB880 (SEQ ID NO:14) (рессуспендированный в свободной от нуклеаз воде до концентрации 10 мкМ)	0,01 мкл	0,4 мкМ конечная концентрация
5	Меченный VIC™ праймер PB2931 (SEQ ID NO: 15) (рессуспендированный в свободной от нуклеаз воде до концентрации 10 мкМ)	0,01 мкл	0,15 мкМ конечная концентрация
6	ДНК-полимераза REDTaq (1 единица/мкл)	1,0 мкл (рекомендуется заменить пипетки до следующей стадии)	1 единица/реакцию
7	Экстрагированная ДНК (матрица):  - Анализируемые образцы (индивидуальные листья) - Отрицательный контроль  - Отрицательный контроль - Положительный контроль  - Положительный контроль	2,0 мкл  - 4-80 нг геномной ДНК - 4 нг геномной ДНК нетрансгенной кукурузы - без ДНК-матрицы (раствор, в котором рессуспендирована ДНК)  - 4 нг геномной ДНК из известного случая гетерозиготной кукурузы MON89034  - 4 нг геномной ДНК из известного случая гомозиготной кукурузы MON89034	Разведенная в воде
8	Осторожно смешать, добавить 1-2 капли минерального масла на верх каждой реакции		

Для ведения следующих параметров циклического повторения успешно использовались амплификации ДНК в робоцикльере Stratagene, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, или термоцикльере Eppendorf Mastercycler Gradient, или системе для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, или термоцикльере MJ Research DNA Engine PTC-225. При использовании Eppendorf Mastercycler Gradient или MJ Engine циклы повторяли рассчитанным образом. При использовании Perkin-Elmer 9700 циклы повторяли со скоростью отслеживания нагрузки, установленной на максимум.

Таблица 4. Условия термоциклира<sup>a</sup> для анализа зиготности

Число циклов в следующем порядке	Температура и продолжительность
1	50°C 2 минуты
1	95°C 10 минут
10	95°C 15 секунд 64°C 1 минута (-1°C/цикл)
30	95°C 15 секунд 54°C 1 минута
1	10°C выдержка

<sup>a</sup> - используя систему для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700.

Семена, соответствующие трансгенному случаю MON89034, были депонированы 28 марта 2006 г. в соответствии Будапештским соглашением в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. Номером поступления в ATCC или обозначением патентного депонирования является PTA-7455. Депонированный материал будет сохраняться в депозитарии в течение периода, составляющего 30 лет, или 5 лет после последнего запроса, или в течение срока действия патента, что дольше, и будет заменяться, если необходимо, во время этого периода.

После иллюстрации и описания принципов настоящего изобретения квалифицированным в данной области техники специалистам должно быть понятно, что компоновку и детали настоящего изобретения можно модифицировать, не выходя за пределы таких принципов. Авторы настоящего изобретения заявляют права на все модификации, которые находятся в пределах сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации и опубликованные патентные документы, процитированные в этом описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и индивидуально указано для каждой индивидуальной публикации или заявки на патент, что она включена посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение кукурузы или его часть, обладающие устойчивостью к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, содержащие нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

2. Растение или его часть по п.1, где образец семян указанного растения депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа PTA-7455.

3. Клетка растения кукурузы, обладающая устойчивостью к заражению насекомыми паразитами Lepidoptera, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

4. Клетка растения кукурузы по п.3, где образец семян указанного растения депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа PTA-7455.

5. Продукт, полученный из растения кукурузы, его частей по любому из пп.1, 2, который содержит указанную молекулу ДНК и выбран из группы, состоящей из кукурузного толокна, кукурузного масла, кукурузной лепешки, кукурузного семени, кукурузных ростков, кукурузного крахмала, кукурузной муки, кукурузной пыльцы, кукурузного шелка, жидкого кукурузного экстракта, кукурузного солода, кукурузного сахара, кукурузного сиропа, маргарина, получаемого из кукурузного масла, сухих продовольственных товаров из барды (DDGS).

6. Способ получения устойчивого к насекомым растения кукурузы, включающий:

- (a) скрещивание растения кукурузы по любому из пп.1, 2 с другим растением кукурузы;
- (b) получение потомства растения от указанного скрещивания (a);

(c) отбор потомства, которое содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, причем указанное отобранное потомство является устойчивым к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera.

7. Способ по п.6, в котором указанная стадия отбора (c) включает проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты у указанного потомства растения, полученного на стадии (b), причем отбирают потомство, которое продуцирует ампликон, содержащий по крайней мере одну нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, или проведение реакции гибридизации нуклеиновых кислот у указанного потомства растения, полученного на стадии (b), причем отбирают потомство, которое содержит последовательность ДНК, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностями ДНК, выбранными из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

8. Способ получения устойчивого к насекомым паразитам отряда Lepidoptera растения кукурузы, включающий:

(a) трансформацию клетки растения кукурузы нуклеотидной последовательностью, содержащей SEQ ID NO:5; и

(b) регенерацию растения кукурузы из указанной трансформированной клетки, причем указанное растение кукурузы содержит указанную нуклеотидную последовательность и является устойчивым к насекомым паразитам отряда Lepidoptera.

9. Способ защиты растения кукурузы от заражения насекомыми паразитами отряда Lepidoptera, включающий введение в пищевой рацион вредителя кукурузы отряда Lepidoptera инсектицидно эффективного количества клеток(и) или тканей(и) трансгенного растения кукурузы или его частей, по любому из пп.1, 2.

10. Способ по п.9, в котором указанный вредитель отряда Lepidoptera выбран из группы, состоящей из осеннего походного червя (*Spodoptera frugiperda*), кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*), хлопковой совки (*Helicoverpa zea*), юго-западной кукурузной огневки (*Diatraea grandiosella*) и совки ипсилон (*Agrotis ipsilon*).

11. Пара молекул ДНК, содержащая первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем молекулы ДНК содержат по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов SEQ ID NO:5, или SEQ ID NO:3, или

SEQ ID NO:4, или комплементарную им последовательность для функционирования в качестве ДНК-праймеров или зондов, диагностических в отношении ДНК, экстрагированной из растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, или его потомства.

12. Пара молекул ДНК по п.11, в которой указанная первая молекула ДНК содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов участка ДНК-вставки SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:5, или комплементарную им последовательность, а указанная вторая молекула ДНК содержит 5' фланкирующую последовательность, входящую в состав SEQ ID NO:3, или комплементарную ей последовательность схожей длины.

13. Пара молекул ДНК по п.11, в которой указанная первая молекула ДНК содержит по крайней мере 20 непрерывных нуклеотидов, комплементарных участку ДНК-вставки SEQ ID NO:5, а указанная вторая молекула ДНК содержит по крайней мере 20 непрерывных нуклеотидов из геномного участка SEQ ID NO:3.

14. Пара молекул ДНК по п.11, в которой указанная первая молекула ДНК специфически гибридизуется с SEQ ID NO:5 от приблизительно нуклеотида 2060 до приблизительно нуклеотида 12208, а указанная вторая молекула ДНК специфически гибридизуется с обратно комплементарной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:3, от приблизительно нуклеотида 1 до приблизительно нуклеотида 2050.

15. Пара молекул ДНК по п.11, в которой указанная первая молекула ДНК содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов участка ДНК-вставки SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:5, или комплементарной им последовательности, а указанная вторая молекула ДНК содержит 3' фланкирующую последовательность, входящую в состав SEQ ID NO:4, или комплементарную ей последовательность схожей длины.

16. Пара молекул ДНК по п.15, в которой указанная первая молекула ДНК содержит по крайней мере 20 непрерывных нуклеотидов из участка последовательности SEQ ID NO:5 от нуклеотида 2072 до нуклеотида 11294, а указанная вторая молекула ДНК содержит по крайней мере 20 непрерывных нуклеотидов, комплементарных нуклеотидам участка от нуклеотида 11315 до нуклеотида 12208 последовательности SEQ ID NO:4.

17. Пара молекул ДНК по п.15, в которой указанная первая молекула ДНК специфически гибридизуется с обратно комплементарной последовательностью, соответствующей SEQ ID NO:5, от приблизительно нуклеотида 1 до приблизительно нуклеотида 11305, а указанная вторая молекула ДНК специфически гибридизуется с SEQ ID NO:4 от приблизительно нуклеотида 21 до приблизительно нуклеотида 914.

18. Пара молекул ДНК по любому из пп.11-17, в которой указанная первая молекула ДНК содержит SEQ ID NO:6, а указанная вторая молекула ДНК содержит SEQ ID NO:7.

19. Способ обнаружения в биологическом образце растения кукурузы ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий:

(а) приведение в контакт указанного биологического образца с парой молекул ДНК, раскрытой в любом из пп.11-18;

(б) обеспечение условий для реакции амплификации нуклеиновой кислоты;

(с) проведение указанной реакции амплификации с получением молекулы ДНК-ампликона, причем обнаружение ампликона, содержащего по крайней мере одну из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или комплементарной им последовательности, указывает на наличие искомой молекулы ДНК в указанном биологическом образце.

20. Способ обнаружения в биологическом образце растения кукурузы ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий:

(а) приведение в контакт указанного биологического образца с ДНК-зондом, который содержит SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, или комплементарную им последовательность и гибридизуется в жестких условиях с одной или несколькими нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:1, или SEQ ID NO:2, или комплементарными им последовательностями;

(б) обеспечение жестких условий гибридизации для указанного биологического образца и ДНК-зонда, причем обнаружение гибридизации указывает на наличие искомой молекулы ДНК в биологическом образце.

21. Способ по п.20, в котором указанный ДНК-зонд содержит SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или комплементарную им последовательность.

22. Способ по любому из пп.20 или 21, в котором указанный ДНК-зонд помечен по крайней мере одним флуорофором.

23. Способ по п.19 или 20, в котором указанный биологический образец выбран из группы, состоящей из кукурузного толокна, кукурузного масла, кукурузной лепешки, кукурузного семени, кукурузных ростков, кукурузного крахмала, кукурузной муки, кукурузной пыльцы, кукурузного шелка, жидкого ку-

кукурузного экстракта, кукурузного солода, кукурузного сахара, кукурузного сиропа, маргарина, получаемого из кукурузного масла, сухих продовольственных товаров из барды (DDGS).

24. Набор для обнаружения ДНК, представленной последовательностью SEQ ID NO:5, содержащий по крайней мере две ДНК-молекулы, содержащие по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов последовательностей SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, или SEQ ID NO:5, или последовательностей, комплементарных указанным, для функционирования в качестве ДНК-праймера или зонда, специфического для растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, и/или его потомства.

25. Набор для обнаружения ДНК по п.24, в котором указанная по крайней мере одна молекула ДНК содержит SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или комплементарную им последовательность.

26. Набор для обнаружения ДНК по п.25, в котором указанная по крайней мере одна молекула ДНК представляет собой SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или комплементарную им последовательность.

27. Набор для обнаружения ДНК по п.24, который содержит пару молекул ДНК по любому из пп.11-18.

28. Способ определения в биологическом образце зиготности ДНК растения кукурузы, содержащего SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, включающий:

(а) приведение в контакт указанного образца с набором праймеров, содержащих SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:10, который (1) при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, приводит к образованию первого ампликона, который является диагностическим для растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, и (2) при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты, содержащей геномную ДНК кукурузы, отличную от ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, приводит к образованию второго ампликона, который является диагностическим для геномной ДНК кукурузы, отличной от ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455;

(б) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, причем обнаружение обоих указанных выше ампликонов свидетельствует о том, что образец является гетерозиготным по ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, а обнаружение только первого из указанных выше ампликонов свидетельствует о том, что указанный образец является гомозиготным по ДНК растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455.

29. Способ по п.28, в котором указанный набор праймеров дополнительно используют вместе с SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:15.

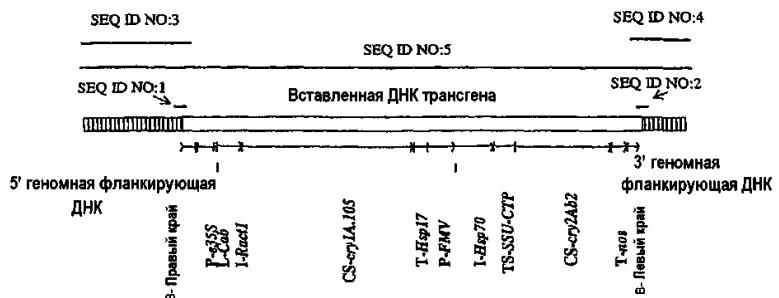
30. Устойчивое к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera растение или его потомство, содержащее последовательность SEQ ID NO:5.

31. Устойчивое к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera семя растения, содержащее последовательность SEQ ID NO:5.

32. ДНК-праймер для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере 30 непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:3 или комплементарной ей последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:1.

33. ДНК-праймер для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере 30 непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:4 или комплементарной ей последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:2.

34. Набор для обнаружения ДНК трансгенного растения кукурузы, содержащего в своем геноме последовательность SEQ ID NO:5, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа РТА-7455, содержащий по меньшей мере две молекулы из 30 или более непрерывных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO:3, или SEQ ID NO:4, или комплементарной им последовательности, который используется в способе амплификации ДНК с получением ампликона, содержащего SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.



## Список последовательностей

- <110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC  
Anderson, HEATHER  
Douglas, Jennifer  
GROAT, JEANNA  
JOHNSON, SCOTT  
KELLY, REBECCA  
KORTE, JOHN  
RICE, JAMES

<120> РАСТЕНИЕ КУКУРУЗЫ И СЕМЯ, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ТРАНСГЕННОМУ СЛУЧАЮ  
MON89034, И СПОСОБЫ ЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 11899.0260.000PC00

<150> PCT/US2007/069662  
<151> 2007-05-24

<150> 60/808,834  
<151> 2006-05-26

<160> 22

<170> Патент версии 3.3

<210> 1  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
<223> 5' последовательность стыка, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях  
2051-2071

<400> 1  
aatgagtatg atggatcagc a 21

<210> 2  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
<223> 3' последовательность стыка, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях  
11295-11314

<400> 2  
actcattgc a tccccggaaa 20

<210> 3  
<211> 2071  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

<223> 5' фланкирующая последовательность плюс стык, соответствующие  
SEQ ID NO:5 в положениях 1-2071

<400> 3	
aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgttc	60
ttttgaagt ttcaaaaggg agcttcagg gtcgcttaga gtttgggg ttggaaatac	120
aagcggaaag agagctaattt agggggacat ccatatggg tattttttt gaataagagt	180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa ttttttttta gctacgttgt tccaaaaat	240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg	300
ccccccggg tgcgtccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc	360
gggttttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgggggtgg	420
cgagaaagct ggggaaagaaa aaggctagta catatgattt gtctgtgaac ctgtgaggtg	480
ggtaggtagg taggtggaga ttttttttaa ctgggtttgt tgacggactc gaacggggcc	540
gggcgtgtgg tgcgtccgtc tgcgtccgtt ccagccagcc acacatcagc	600
gagcatgcag agcttaagca tgcgttacg gatcggtttt cttttttttt aagggtgtgt	660
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc caaaagccaa ccaagggtgt	720
attttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	780
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	840
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	900
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	960
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1020
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1080
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1140
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1200
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1260
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1320
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1380
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1440
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1500
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1560
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1620
tttttttttttggc ttttttttttggc cccttttttttggc aaaaacccaa aaaaacccaa	1680

cacggaccgc ggcgtctgtc gatcgccggc tcgcccgcgc gcagctaccc agcacgctca 1740  
 cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccctg ccgcctgccc 1800  
 gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatttct cctccacac gggctacgac 1860  
 gtgagcacga gtactggat ccccgatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920  
 actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc 1980  
 cattcaaatt cagggtccca cgtacgtca ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040  
 aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc a 2071

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 914

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; ИСКУССТВЕННАЯ

&lt;220&gt;

<223> 3' фланкирующая последовательность плюс стык, соответствующие  
SEQ ID NO:5 в положениях 11295-12208

&lt;400&gt; 4

actcattgca tccccggaaa ttatgtttt ttaaaaacca cggtattata gataccgtgt 60  
 tatttttga gtattggaaa tttcatttca acccaaagtt tcttcattggc acatctagct 120  
 tttgcctaat accatgttagg gctacatctt aaaaatctat actactatata taaagctgca 180  
 ggggttagcct gtctccaccc ggttctgcct cgagccaaatc taaaccgtcc atctatatcc 240  
 atcaaattcag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgttattcag ttgcatactt 300  
 gcagcagggtt ctccctctc accatttctt ctgcctctc tctcgtcact tggcagatt 360  
 catcctgcct ctcccgcatg cgtccctcc ccatggcccg tctcgtcacta tcgcccacacc 420  
 tcaccgcggg gagacgaaga cgggtggacgc atcctcaccc cttccgttag ttgtcgtct 480  
 tccatccctt tcaacaactt ctacataggg agaggcggtt cggcgatcccg acgcccggc 540  
 ttctccctc cccatggagg acgagaacat cgacccgcgc ggcggggggcg atgcctccgc 600  
 tctgcataga ggagggttgt agtggcaagc agcaatgcca acaccgaggc gggcaagac 660  
 taggcaacaa taggacggca cgcgggttg tcagcgaggt ggccggcatcg tgcgtcgata 720  
 ccgaacaaaca tctccggcgc tggagtcgggt gagttactgc gccacccggc cgcctcaat 780  
 gcactgatata tctccggcgc tccatcgccg cccttcctcc cttccctctc cctgtgcctc 840  
 cctctcttgc cctctccctt ccaactgtcc cgcggccagc cctagcccaa ccacccggc 900  
 cgcagggtca ccaa 914

&lt;210&gt; 5

<211> 12208  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> 5' фланкирующая последовательность плюс вставленная  
 последовательность ДНК плюс 3' фланкирующая последовательность

<400> 5		
aatatttaaa aatggaaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgccttc	60	
ttttgaagt ttcaaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgggttg ttggaaatac	120	
aagcgaaaag agagctaatg agggggacat ccataatttc tatgggttt gaataagagt	180	
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa ttttttgtt gctacgttgt tccaaaaat	240	
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg	300	
cgcggccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc	360	
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcgggggtgg	420	
cgagaaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattt gtctgtgaac ctgtgaggtg	480	
ggtaggttagg taggtggaga tttttgttaa ctgggtttgt tgacggactc gaacggggcc	540	
ggcggtgtgg tgtggctagc tgtgggttt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc	600	
gagcatgcag agcttaagca tggatgtacg gatcggttt ctttagcggtt aagggtgtgt	660	
ttggtttggc tttttggctt ggctttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt	720	
atttggtttgc actttttggct tttggctttt gtccccctaaa agccaaaagc caaacaagg	780	
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag	840	
cacccctgaa cctgctttt gtggctttc gaatggact gtggaaacat atatcgaaga	900	
acttttaacg acttttagt gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc	960	
tacaacagct ttttccacag ctcacagecc acagcaactt ttttccacagc cacagccaa	1020	
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc	1080	
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggctttggta tggaactgtg	1140	
aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtggtt tccacccaaac gatttctagc	1200	
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttccacagc tcacagccca caacaacttt	1260	
ttctacagcc acaacccaaac caaacggacc ctaaggcgcc cgagcggcgcaaaagcgtcg	1320	
tcagcttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgcgt ctctggccgt cgtcagccac	1380	
catccaaacaa ggccgggtgt actggcggtc cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct	1440	
ccaccgggtcg ccggccgtcca ctcaccaatc aacacggaaac gccccaaaca cacacacacg	1500	

cacgctgggg	aggaaaaaaa	aggcaagagac	atatgcgtgc	gtcgctgcat	tattgtacgc	1560
gatcgaatgg	catctctctc	actctctctc	ctccctttat	taatctggta	ctggctagct	1620
ggtccggcga	cacccgacgtg	tcagctccgt	cgcgcgcgtc	cgtccgtccg	ctggagcgga	1680
caoggaccgc	ggcgtctgtc	gatgcggcgc	tcgcgcgcgc	gcagctacct	agcacgctca	1740
cgcacatgtac	actgcctaca	cgcacacggc	cggccaaaaa	gcgttccctg	ccgcctgccc	1800
gccggctttt	ttattattat	tggaacatga	ggctatttct	cctcccacac	gggctacgac	1860
gtgagcacga	gtactggat	ccccggatcc	gccctctctg	tccctgtgc	tactccagcc	1920
actgaaatgt	tgtcagatga	aacagcagag	ccgatctccg	cacggaaacc	catgcacggc	1980
cattcaaatt	caggtgccca	cgtacgtcag	ggtgctgctg	ctactactat	caagccaata	2040
aaaggatggt	aatgagttatg	atggatcagc	aatgagttatg	atggtaataa	tggagaaaaaa	2100
gaaagagtaa	ttaccaattt	ttttcaattt	caaaaatgt	gatgtccgca	gcgttattat	2160
aaaatgaaag	tacatttga	taaaacgaca	aattacgatc	cgtcgttattt	ataggcgaaa	2220
gcaataaaaca	aattattcta	attcgaaat	ctttatttcg	acgtgtctac	attcacgtcc	2280
aaatgggggc	ttagatgaga	aacttcacga	tttggcgcgc	caaagcttgg	tcgagtgaa	2340
gctagcttcc	cgatcctacc	tgtcacttca	tcaaaaggac	agtagaaaaag	gaaggtggct	2400
cctacaaatg	ccatcattgc	gataaaggaa	aggccatcgt	tgaagatgcc	tctgccgaca	2460
gtggtcccaa	agatggaccc	ccacccacga	ggagcatcgt	ggaaaaagaa	gacgttccaa	2520
ccacgttcc	aaagcaagt	gattgatgt	atatctccac	tgacgttaagg	gatgacgcac	2580
aatccccacta	tccttcgcaa	gacccttcct	ctatataagg	aagttcattt	cattggaga	2640
ggacacgctg	acaagctgac	tctagcagat	cctctagaac	catcttccac	acactcaagc	2700
cacactattt	gagaacacac	agggacaaca	caccataaga	tccaaaggag	gcctccgccc	2760
ccgcccgtaa	ccaccccgcc	cctcttcctt	ttctttctcc	gtttttttt	cogtctcggt	2820
ctcgatcttt	ggccttggta	gtttgggtgg	gcgagaggcg	gtttcgtgcg	cgccccagatc	2880
ggtgcgcggg	aggggcggga	tctcgccgt	ggggctctcg	ccggcgtgga	tccggcccg	2940
atctcgccggg	gaatggggct	ctcgatgt	gatctgcgt	ccggcgttgt	tggggagat	3000
gatgggggggt	ttaaaaattt	cgcgcgtcta	aacaagatca	ggaagagggg	aaaagggcac	3060
tatggtttat	atttttat	atttctgt	cttcgtcagg	cttagatgt	ctagatcttt	3120
ctttcttcctt	tttgcggta	gaatttgaat	ccctcagcat	tgttcatcgg	tagttttct	3180
tttcatgatt	tgtgacaaat	gcagcctcgt	gccccggctt	tttgttagta	gaagtgtatca	3240
accatggaca	acaacccaaa	catcaacgag	tgcacccgt	acaactgcct	cagcaaccct	3300

gaggtcgagg tgctcgccgg tgagcgcatc gagaccggtt acaccccat cgacatctcc 3360  
 ctctccctca cgcagttcct gtcagcgag ttctgtccag gcgctggctt cgtcctggc 3420  
 ctcgtggaca tcatctgggg catcttggc ccctcccagt gggacgcctt cctggtgcaa 3480  
 atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gagttcgcca ggaaccaggc catcagccgc 3540  
 ctggaggggcc tcagcaacct ctaccaaatac tacgctgaga gttcccgaga gtgggaggcc 3600  
 gaccccacta acccagctct ccgcgaggag atgcgcatac agttcaacga catgaacagc 3660  
 gccctgacca ccgcacatccc actcttcgac gtcagaactt accaagtccc gctctgtcc 3720  
 gtgtacgtcc agggccgacaa cctgcacctc agcgtgtga gggacgtcag cgtgtttggc 3780  
 cagaggtggg gtttcgacgc cgccaccatc aacagccgct acaacgaccc caccaggctg 3840  
 atcggcaactt acaccgacca cgctgtccgc tggtaacaaca ctggccgtcc tggacattgt 3900  
 gtccctcttc ccgaactacg actcccgac ctaaccgatc cgcaccgtgt cccaaactgac 3960  
 ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcctgga gaacttcgac ggttagctca ggggcagcgc 4020  
 ccaggccatc gagggtccca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagcatcac 4080  
 tatctacacc gatgcccacc gggcgagta ctactggtcc ggcaccaga tcatggcctc 4140  
 cccggtcggc ttcaagcgcc ccgagttac ctccctctc tacggcacga tggcaacgc 4200  
 cgctccacaa caacgcatacg tgcgtcgtt gggccaggcc gtcgtccgc ccctgagctc 4260  
 caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt cgcgtccgtt 4320  
 tggcaactgag ttccgttacg gcaccccttc caacctgccc tccgtgtct accgcaagag 4380  
 cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca 4440  
 gggttttcc cacaggctca gcaacgtgtc catgttccgc tccggcttca gcaactcgtc 4500  
 cgtgagcatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtgtgtct agttcaacaa 4560  
 catcattgca tccgacagca ttactcaaacccttggaa aagcacata cacttcagtc 4620  
 aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtgcacaag 4680  
 tggaggaccc ttgttttaca ctattgttacatcaatggc caattggccc aaaggtatcg 4740  
 tgcaagaatc cgctatgcct ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcagggtga 4800  
 aaggatctt gctggtcagt tcaacaagac tatggatacc ggtgaccctt tgacattcca 4860  
 atcttttagc tacgcaacta tcaacacagc ttatcatcc ccaatgagcc agagtagtt 4920  
 cacagtaggt gctgacactt tcaagctcagg gaatgaagtt tacatcgaca ggtttgaatt 4980  
 gattccagtt actgcaaccc tcgaggctga gtacaacctt gagagagccc agaaggctgt 5040  
 gaacgcctc ttacccatca ccaatcagct tggctgaaa actaacgtta ctgactatca 5100

cattgaccaa gtgtccaaact tggcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa 5160  
 gcgtgaactc tccgagaaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatcttt 5220  
 gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac 5280  
 cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca ccctctccgg 5340  
 aactttcgac gagtgctacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa 5400  
 agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta 5460  
 ctcgatcagg tacaatgcca agcacgagac cgtgaatgtc ccaggtactg gttccctctg 5520  
 gccactttct gcccaatctc ccattggaa gtgtggagag cctaacagat gcgcctccaca 5580  
 ctttgagtgg aatcctgact tggactgctc ctgcaggat ggcgagaagt gtgcccacca 5640  
 ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctgg 5700  
 agtctgggtc atcttcaaga tcaagacca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga 5760  
 gtttctcgaa gagaaaccat tggtcggta agctctcgct cgtgtgaaga gagcagagaa 5820  
 gaagtggagg gacaaacgtg agaaactcga atggaaaact aacatcgtt acaaggaggc 5880  
 caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctcccaatat gatcagttgc aagccgacac 5940  
 caacatcgcc atgatccacg ccgcagacaa acgtgtgcac agcattcgta aggcttactt 6000  
 gcctgagttg tccgtgatcc ctgggtgtgaa cgctgccatc ttgcaggaac ttgaggggacg 6060  
 tatctttacc gcattctcct tgcacatgc cagaaacgtc atcaagaacg gtgacttcaa 6120  
 caatggcctc agctgctgga atgtgaaagg tcatgtggac gtggaggaac agaacaatca 6180  
 ggttccgtc ctgggtgtgc ctgagtgaaa agctgaagtg tcccaagagg ttagagtctg 6240  
 tccaggtaga ggctacatcc tccgtgtgac cgcttacaag gagggatacg gtgagggttg 6300  
 cgtgaccatc cacgagatcg agaacaacac cgacgagctt aagttctcca actgcgtcga 6360  
 ggaagaaaatc tatcccaaca acaccgttac ttgcaacgcac tacactgtga atcaggaaga 6420  
 gtacggaggt gcctacacta gccgttaacag aggttacaac gaagtcctt ccgttctgc 6480  
 tgactatgcc tccgtgtacg aggagaaaatc ctacacagat ggcagacgtg agaacccttg 6540  
 cgagttcaac agaggttaca gggactacac accacttcca gttggctatg ttaccaagga 6600  
 gctttagtac tttcctgaga cggacaaagt gtggatcgag atcggtgaaa ccgagggAAC 6660  
 cttcatcgta gacagcgtgg agcttcttctt gatggaggaa taatgagatc tatcgattct 6720  
 agaaggcctg aattctgcat gcggttggac gtatgctcat tcaggttggaa gccaatttgg 6780  
 ttgtatgttg tgcgagttct tgcgagatctg atgagacatc tctgtattgt gtttcttcc 6840  
 ccagtgttt ctgtacttgc gtaatcggtt aatcgccaaac agattcggcg atgaataaaat 6900

gagaaaataaa ttgttctgat tttgagtgc aaaaaaaaagg aattagatct gtgtgtgtt	6960
tttggatccc cggggcggcc gcgttaacaa gctttagctc aggatttagc agcattccag	7020
atgggttca atcaacaagg tacgagccat atcactttat tcaaatttgt atcgccaaaa	7080
ccaagaagga actcccatcc tcaaagggtt gtaaggaaga attctcagtc caaagcctca	7140
acaaggtagt ggtacagagt ctccaaacca ttagccaaaa gctacaggag atcaatgaag	7200
aatcttcaat caaagtaaac tactgttcca gcacatgcat catggctagt aagtttcaga	7260
aaaagacatc caccgaagac ttaaagttag tgggcacatctt tgaaagtaat cttgtcaaca	7320
tcgagcagct ggcttgtgg gaccagacaa aaaaggaatg gtgcagaatt gttaggcgca	7380
cctaccaaaa gcatcttgc ctattttgc aagataaagc agattccct agtacaagtg	7440
ggaaacaaaa taacgtggaa aagagctgtc ctgacagccc actcactaat gcgtatgacg	7500
aacgcagtga cgaccacaaa agaattccct ctatataaga aggcattcat tcccatattga	7560
aggatcatca gatactcaac caatccctt aggatctacc gtcttcggtt cgcgctact	7620
ccgcctctg cttttgttac tgccacgtt ctctgaatgc tctttgtgt ggtgattgt	7680
gagagtggtt tagctggatc tagaattaca ctctgaaatc gtgttctgcc tgtgctgatt	7740
acttgcgcgc cttttagtgc gcaaaatata gggacatggt agtacgaaac gaagatagaa	7800
cctacacagc aatacgagaa atgtgttaatt tggtgcttag cggattttat ttaagcacat	7860
gttgggttta tagggcactt ggattcagaa gtttgcgtt aatttagcga caggcttcat	7920
actacatggg tcaatagttt agggattcat attataggcg atactataat aatttgcgt	7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattccat tctgttttg tttgtgtgt	8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgtt gtttatctct	8100
gctcccttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaata ttgtgtctg	8160
aagaaataag tactgacagt attttgcgtt attgatctgc ttgtttgtt taacaaaatt	8220
taaaaataaa gagtttccctt ttgtgtgtc tcttacccctt ctgtatggat ctatgtatcta	8280
ccaaactgaca ctatattgtt tctcttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag	8340
tgttgcaccag tgttactcac atagtcatttgc ctcatatccat tgtaatgcag ataccaagcg	8400
gcctctagag gatcagcatg gcccaccccg tgatgtggc ctgcgtggcc accggccgtcg	8460
ctccgttcca ggggctcaag tccaccgcac gcctcccccgt cgcccgccgc tcctccagaa	8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaaagga tccgggtgcac gcaggtaaca aatgcaccc	8580
agcttagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gtttagtaata ggaaggaaac	8640
tgtatgttcca tgcgtggact gatgtgtgtt gccccatccccca tccccatttcc caacccaaaa	8700

cgaaccaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagttcga 8760  
 gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc atccgctgca tgcaaggccat 8820  
 ggacaactcc gtcctgaact ctggtcgac caccatctgc gacgcctaca acgtcgccgc 8880  
 gcatgatcca ttcagottcc agcacaagag cctcgacact gttcagaagg agtggacgga 8940  
 gtggaagaag aacaaccaca gcctgtacct ggaccccatc gtcggcacgg tggccagott 9000  
 ccttctcaag aaggctggct ctctcgctgg gaagcgcac tcctcggaaac tccgcaacct 9060  
 gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctcaggaga ccgagaagtt 9120  
 tctcaaccag cgcctcaaca ctgataccct tgctcgctgc aacgctgagc tgacgggtct 9180  
 gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttccctcaacc ccaaccgcaa 9240  
 tgccgtgcct ctgtccatca cttcttcgt gaacaccatg caacaactgt tccctaaccg 9300  
 cttgcctcag ttccagatgc aaggctacca gctgctcctg ctgccactct ttgctcaggc 9360  
 tgccaaacctg cacctctct tcattcgtga cgtgatcctc aacgctgacg agtggggcat 9420  
 ctctgcagcc acgctgagga cctaccgcga ctacctgaag aactacacca gggactactc 9480  
 caactattgc atcaacaccc accagtcggc cttcaaggc ctcaatacga ggcttcacga 9540  
 catgctggag ttcaggaccc acatgttctt gaacgtgttc gagtacgtca gcatctggtc 9600  
 gctcttcaag taccagagcc tgctgggtgc cagccggcc aacctctacg ccagccgctc 9660  
 tggcccccaa caaaactcaga gtttaccatg ccaggactgg ccattctgtt attcgttgtt 9720  
 ccaagtcaac tccaaactacg tcccaacgg cttctctgtt gctcgctct ccaacaccc 9780  
 ccccaacatt gttggccctcc cggcgtccac cacaactcat gctctgtttc ctgcccaggat 9840  
 gaactactcc ggcggcatct cgagccgcga cattggtgca tcgcccgttca accagaactt 9900  
 caactgctcc accttctcgc cggcgtgtt caccctgttca gtgagggtctt ggctcgacag 9960  
 cggctccgac cgcgaggggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt cttcgagac 10020  
 cacccttggc ctccggagcg ggccttcac ggcgcgttgg aattctaact acttccccga 10080  
 ctacttcatc aggaacatct ctgggtttcc tctcgctgac cgcaacgagg acctccggcc 10140  
 tccactgcac tacaacgaga tcaaggaacat cgcctctccg tccggacgc ccggaggtgc 10200  
 aagggcgtac atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcatgagaa 10260  
 cggcgtccatg atccacctgg cggccaaatga ttacaccggc ttcaccatct ctccaaatcca 10320  
 cgcaccccaa gtgaacaacc agacacgcac cttcatctcc gagaagttcg gcaaccagg 10380  
 cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gggcaacgg 10440  
 caacagctac aacctgtacc tgcgctcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500

catcaacggg agggtgtaca cagccaccaa tgtgaacacg acgacccaaca atgatggcgt 10560  
caacgacaac ggcccccgtc tcagcgacat caacattggc aacgtggtgg ccagcagcaa 10620  
ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggcacccagt tcgacctcat 10680  
gaacatcatg ctggtgccaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740  
atgggaattc ccgatcggttc aaacatttgg caataaaagtt tcttaagatt gaatctgtt 10800  
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860  
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggtttta tgatttagt cccgcaatta 10920  
tacattnaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcc 10980  
gcgggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcccggcggg ggaattcggt 11040  
accaagctt ggcgcgccaa atcgtaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 11100  
tgttagacacg tcgaaataaa gattccgaa ttagaataat ttgtttattt ctttcgccta 11160  
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgaaaa atcaaaatgt actttcattt tataataacg 11220  
ctgcggacat ctacattnntt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt cttttctcc 11280  
atattgacca tcatactcat tgcatccccg gaaattatgt tttttaaaa accacggtat 11340  
tatagatacc gtgttatttt ttgagttattt gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400  
tggcacatct agttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460  
atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520  
gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggccgtg cgcacccctt ctcccgctat 11580  
tcagttgtcat acttgcagca gtttctccct ctcaccatt tcctctgcct cctctctcgc 11640  
tcactggtca gattcatctt gcctctcccg catgcgttcc ctcccccatttcc cccgttccgc 11700  
actatcgcca cacctcacccg cggggagacg aagacggtgg acgcacccctt acctccctcg 11760  
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggg gtttcggcgt 11820  
cccgacgccc ccgcttctcc cctcccccatttcc gaggacgaga acatcgaccc cggccggcggg 11880  
ggcgtgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtgtggc aagcagcaat gccaacacccg 11940  
aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcaccccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000  
atcggtgtcc gctaccgaac aacatctccg gcgctggagt cggtgagttt ctgcgcacc 12060  
cgacgcccctt ccgttccatc ttgccttcccttcc ccttccaaact gtcggccccc cagcccttagc 12120  
tctccctgtt cctcccttcc ttgccttcccttcc ccttccaaact gtcggccccc cagcccttagc 12180  
ccaaaccacctt cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Синтетическая последовательность, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях 2034-2055

<400> 6  
 gccaataaaa ggatggtaat ga 22

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> Синтетическая последовательность, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях 11345-11367

<400> 7  
 ctttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  
 <400> 8  
 ggtatccctc cagaccagca 20

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  
 <400> 9  
 gtggactcct tctggatgtt gtaa 24

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400> 10	
gtcagggtgc tgctgctgct a	21
<210> 11	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400> 11	
ggttaagaa ccattttgct ccc	23
<210> 12	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая последовательность, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях 2003-2026	
<400> 12	
tacgtcaggg tgctgctgct acta	24
<210> 13	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400> 13	
atratattycg gggatgcaac caac	24
<210> 14	
<211> 16	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Синтетическая последовательность, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях 2061-2076	
<400> 14	
atggatcagc aatgag	16

<210> 15  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 15  
  
 ctgtcaagcc aataaaaaggg ttgttt 26

<210> 16  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 16  
  
 ctgtcaagcc aataaaaaggg ttgttt 26

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 17  
  
 caactcgtcc gtgagcatca 20

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность; обратнокомплементарная  
 последовательности, соответствующей SEQ ID NO:5 в  
 положениях 4605-4628

<400> 18  
  
 aactcagcac tacgggttat ccaa 24

<210>	19	
<211>	16	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400>	19	
gcctgccgca gaccaa		16
<210>	20	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400>	20	
caatgcagag ctcagcttca tc		22
<210>	21	
<211>	17	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая последовательность, соответствующая SEQ ID NO:5 в положениях 4587-4603	
<400>	21	
cagagctcct atgttct		17
<210>	22	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	
<400>	22	
tccagtaacgt gcagtccttc ctccct		26

